
TREK
DIAGNOSTIC SYSTEMS
MAGELLAN BIOSCIENCES

English

VersaTREK® Myco Streptomycin, 7120-30

INTENDED USE
The VersaTREK Myco Streptomycin test is a rapid qualitative procedure for *in vitro* susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, from culture, to streptomycin. VersaTREK Myco Streptomycin is used with the VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) and the ESP® Culture System II (ESP).

SUMMARY AND EXPLANATION
Rapid diagnosis of tuberculosis is important for initiation of appropriate drug therapy and institution of measures to prevent the spread of this highly contagious disease. Delayed treatment, particularly of multiple-drug-resistant *M. tuberculosis* (MDR-TB) strains, can result in treatment failure and patient mortality.[1] To address these issues, clinical microbiologists are urged to use the most sensitive and rapid diagnostic tests that provide reliable results. Experts at the CDC have made several recommendations regarding Mycobacterial testing, including the use of both a liquid and solid medium for Mycobacterial culture. [2]

For streptomycin susceptibility testing of *M. tuberculosis*, The VTI/ESP System combines a liquid culture medium (VersaTREK Myco Broth), a growth supplement (VersaTREK Myco GS), and specific concentrations of streptomycin with a detection system that automatically incubates and continuously monitors culture inoculated with isolates of *M. tuberculosis* from a variety of specimen sources. The sponges in the VersaTREK Myco bottles provide a growth support matrix and increase the surface area exposed to headspace oxygen. The technology of the VTI/ESP System is based on the detection of headspace pressure changes within a sealed bottle due to microbial growth. A special algorithm has been developed for detection of very slow growing Mycobacteria.

With the VTI/ESP System, anti-tuberculosis drug streptomycin can be injected into VersaTREK Myco bottles supplemented with VersaTREK Myco GS. An inoculum of a confirmed culture of *M. tuberculosis* grown from a seed bottle is added to a drug-free control bottle, used as a positive control, and to a test bottle containing streptomycin. If the organism is susceptible to the drug, delayed or no microbial growth will be detected. If the organism is resistant to streptomycin, microbial growth will be detected by the generation of a curve exhibiting a downward excursion from the baseline. The time to detection of drug-free bottle determines when a test is complete. The drug used in this system is streptomycin which is hydrated with sterile water to a specific critical concentration. The specific drug concentrations for this drug are 2 µg/ml and 8 µg/ml.

The detection of microbial growth in the VTI/ESP System is based on the sensitive measurement of gas production and/or gas consumption within the headspace of a seeded culture bottle. This information is used to generate a pressure curve for each bottle. An internal algorithm analyzes the information to determine the status of each test sample. When a set of conditions is met, a bottle is flagged as positive. There are approximately 10^6 CFU/ml of Mycobacteria at the time of detection.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE
Susceptibility testing of *M. tuberculosis* specimens is performed with the VTI/ESP System by inoculating a suspension of organisms into VersaTREK Myco broth bottles that have been supplemented with VersaTREK Myco GS and VersaTREK Myco Streptomycin. A VersaTREK Connector is attached to each bottle to establish a closed system for monitoring the bottle with the VTI/ESP instrument. A hydrophobic membrane in the VersaTREK Connector prevents aerosolization.

Isolate information is entered into the system computer and the bottles are placed in the instrument for incubation at 35 – 37 ºC under stationary conditions. VTI/ESP System detects Mycobacterial growth by continuously monitoring (every 24 minutes) the rate of consumption of oxygen within the headspace of the culture bottle and reports that growth response with a positive signal. At the end of the specified incubation period, as determined by the drug-free control bottle for each isolate that is tested, the isolate is manually determined to be susceptible or resistant to the drug.

REAGENTS
VersaTREK Myco Streptomycin contains one vial of lyophilized streptomycin. The vial is to be rehydrated with 25 ml of sterile distilled or deionized water.

FORMULA UPON REHYDRATION *

(H2O)	Processed Water	25 ml
(STR)	Streptomycin	0.012% w/v
(SA)	Solubilizing Agent	1.25% w/v

*Adjusted to meet performance criteria.

PRECAUTIONS

1. For *in vitro* diagnostic use.
2. Refer to Material Safety Data Sheets for complete hazard information.
3. WARNING! POTENTIAL INFECTIOUS TEST SPECIMEN. Follow Universal Precautions and institutional policy in handling and disposing of infectious agents.
4. When working with *M. tuberculosis* grown in culture, the recommendation is for Biosafety Level 3 practices, containment equipment and facilities.[3]
5. The VersaTREK Connector contains a sharp recessed needle that is sterile upon first removing the seal, but is potentially contaminated upon termination of use.
6. Visually inspect all bottles for contamination, cracks or other signs of deterioration. Do not use bottles that appear turbid or cracked.
7. Use only needle locking syringes.
8. Autoclave all VersaTREK Myco bottles prior to disposal.

STORAGE

Store at 2-8°C. Protect from light. Upon rehydration, store at 2-8°C and use within 4 weeks, or freeze at -20°C and use within 3 months. Once thawed, do not refreeze.

EXPIRATION DATE

The expiration date applies to the product in its intact (unopened) container when stored as directed. The VersaTREK Streptomycin Test should not be used beyond the indicated expiration date.

PROCEDURE: SUSCEPTIBILITY TESTING OF *M. tuberculosis* USING THE VERSATREK/ESP CUTLURE SYSTEM II

Materials Provided:

VersaTREK Myco Streptomycin	7120-30
VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Connectors	7150-44

Materials Required but Not Provided:

Sterile distilled or deionized Water
Autoclave
Middlebrook 7H10 or other mycobacterial agar or egg-base medium, for purity checks
CO_2 incubator, 37ºC
Sterile loops
Sterile tuberculin syringes with permanently attached needles
Mycobacterial disinfectant (e.g. Amphly™, OMNI™, etc.)
Alcohol swabs
Vortex mixer
Biological safety cabinet
Microscope
Materials for staining slides
Quality Control Organism; *M. tuberculosis* ATCC® 25618

Inoculation of VersaTREK Myco Culture Bottles for Myco Susceptibility Testing

1. Label each VersaTREK Myco culture bottle with identifying information. For streptomycin testing, 3 bottles will be used per test.

2. Disinfect the culture bottle stoppers with alcohol.

3. Aseptically add **1.0 ml** of VersaTREK Myco GS to each culture bottle by injecting through the septum with a needle and syringe.

4. Rehydrate lyophilized VersaTREK Myco Streptomycin by aseptically adding 25 ml of sterile distilled or deionized water. This yields a drug concentration of 120 µg/ml.

5. Aseptically remove 5 ml of the solution and transfer into a sterile container. Add 15 ml of distilled or deionized sterile water. This yields a drug concentration of 30 µg/ml.

6. Aseptically add **1.0 ml** of the 120 µg/ml drug concentration to a culture bottle by injecting through the septum with a needle and syringe. The final streptomycin concentration in the Myco culture bottle is 8 µg/ml.

7. Aseptically add **1.0** ml of the 30 µg/ml drug concentration to a second culture bottle by injecting through the septum with a needle and syringe. The final streptomycin concentration in the Myco culture bottle is 2 µg/ml.

TABLE 1: Anti-Tuberculosis Drug Preparation

Drug and Final Concentration in VersaTREK Myco Bottles	Amount of Diluent Added to Lyophilized Streptomycin	Concentration After Rehydration	Additional Dilutions	Concentration to be Injected into the Test Bottles	Number of Tests per Vial
Streptomycin 8.0 µg/ml	25 ml	120 µg/ml	No	120 µg/ml	20
Streptomycin 2.0 µg/ml		⇓⇒	5 ml diluted drug plus 15 ml water	30 µg/ml	20

8. For the drug-free control bottle, add **1.0 ml** of sterile water in place of the drug. Twenty tests can be performed from a single vial.

9. The inoculum of a specimen for susceptibility testing must be confirmed as a pure culture of *M. tuberculosis* prior to streptomycin testing and prepared as follows:

   a) **McFarland equivalent cell suspension** - Pure isolates (not more than 4-5 weeks old) growing on an appropriate mycobacterial agar medium (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11, Lowenstein-Jensen slants) are scraped using a sterile loop and placed in a tube containing approximately 9 to 10 ml sterile distilled or deionized water and glass beads. The tube is vortexed and allowed to settle for 15 minutes. Approximately 5 ml of the top layer is removed, placed in a sterile test tube and adjusted to a No. 1 McFarland equivalent (approximately 3.0×10^7 CFU/ml) using sterile distilled or deionized water.

   b) **VersaTREK Myco seed bottle** - Prepare a No. 1 McFarland equivalent from an agar or liquid source (growth in Middlebrook 7H9) of the test isolate. Aseptically inject 0.5 ml of this dilution into a VersaTREK Myco culture bottle supplemented with 1.0 ml VersaTREK Myco GS. A sterile VersaTREK Connector is placed on the bottle and the bottle is incubated in the instrument until a positive signal is observed (approx. 10^6 CFU/ml). Once a positive signal is reached, the VersaTREK Connector is removed and the bottle is vortexed for 1-2 minutes. The seed bottle inoculum must be used within 72 hours of the positive instrument signal.

10. Perform a 1:10 dilution of the McFarland No. 1 from agar or the Myco seed bottle in sterile saline or distilled water (inoculum for test). Add 0.5 ml to each control and test broth.

11. Wipe the culture bottles and stoppers with a Mycobactericidal disinfectant.

12. Mix all bottles by inverting several times.

13. Remove the seal from the bottom of a VersaTREK Connector. Press the needle end of the VersaTREK Connector through the culture bottle stopper. NOTE: Do not invert the culture bottle while the connector is on the bottle. Fluid in the needle may interfere with the pressure readings for the bottle.

14. Place the culture bottle with the VersaTREK Connector into the instrument. Refer to the VersaTREK/ESP System Operator's Manual for details on bottle entry.

    Loading suggestion: If the sample accession number is "123", give the streptomycin test bottles accession numbers such as 123PC for the positive control, and 123S2 and 123S8 for the streptomycin test broths. In this way, all bottles associated with this sample accession number will be able to be searched for and located as a group.

15. An alternative method to adding reagents and inocula to broth bottles is to remove the cap and stopper and perform the additions using a sterile pipette. Careful closure of the stopper and cap is required.

RESULTS

For susceptibility testing using the VersaTREK/ESP Culture System II, an isolate is interpreted as being susceptible or resistant to a drug based on the following (round all times of detection to the nearest whole day):

1. After the drug-free bottle has become positive, record the time to detection (this is found on the graph of the test bottle).
2. Three additional days, rounded to the nearest whole number, of incubation after the drug-free control has signaled positive, search and record the results from the other test bottles for the isolate.
3. **Susceptible**: An isolate in a drug-containing bottle that has not signaled within the three-day detection period of the drug-free control is determined to be susceptible at that drug concentration. Growth after the three days, rounded to the nearest whole number, of the growth control bottle signaling positive should be disregarded because it is not considered to be an indication of resistance. To round to the nearest whole number, if time ≤ XX.49 is round down and if time ≥ XX.50 is round up.
4. **Resistant**: Time to detection of drug bottle is ± three days (rounded to the nearest whole number) of the time to detection of the drug-free control bottle (rounded to the nearest whole number). To round to the nearest whole number, if time ≤ XX.49 is round down and if time ≥ XX.50 is round up.

   NOTE:
   - No bottle should flag positive before the third day. Bottles that flag before three days are either contaminated or the inoculum is too high. The test should be repeated.
   - A test bottle may signal before the control bottle (see Table 3 example D).

   All resistant results should be confirmed by an alternate method prior to reporting.

Bottles that signal positive should be stained for AFB (Acid Fast Bacilli) and subcultured to a Middlebrook 7H10 or 7H11 agar plate, as well as a non-selective agar plate (e.g. Blood Agar) to ensure purity of the specimen. Growth control bottles that signal in less than 2.5 days may indicate the presence of a non-Mycobacterial contaminant whereas control bottles that do not signal within 10 days after being inoculated may be indicative or improper bottle preparation. For either situation, the specimen should be retested.

Always review the isolate's graph before reporting. Refer to the Operator's Manual for graph analysis. If graphs for tests that have signaled positive look abnormal, contact TREK Technical Support at 1-800-642-7029 or 1-216-351-8735.

TABLE 2: Test Observations and Test Assessment

Test bottle	Result obtained	Possible cause	Action
Growth control	<3 days from inoculation	Possible contaminant or too heavy inoculum; check purity plates and graphs.	REPEAT TEST
Growth control*	>10 days from inoculation	Non viable organism, too light inoculum	REPEAT TEST
Growth control	Growth detected between 3 and 10 days after inoculation		Valid test - evaluate drug bottles
Purity check	No contaminants observed by at least 18 h on Blood Agar plate		Valid test
	Non-AFB organisms observed	Culture was not pure	REPEAT TEST
	No colonial variation observed on Middlebrook agar plates		Valid test- No action
	Colonial variation observed on Middlebrook agar plates	More than one species of mycobacterium is present	REPEAT TEST to verify results; notify physician that final results are pending

*The upper range of 10 days detection time for the growth control was established by clinical and in-house data.

Be sure to check the subculture results on the mycobacterial agar to verify that only one species of mycobacterium was present, especially in the case of a resistant result.

TABLE 3: Examples of Results for Calculation of Susceptibility of *M. tuberculosis* strains to VersaTREK Myco Streptomycin

Patient	A	B	C	D	E	F	G
Streptomycin Control Positive (Days)	2	4	5	9	10	10	12
Streptomycin Drug Positive (Days)	5	2	6	7	14	13	10
Result	Invalid Growth Control, Repeat Test	Invalid, Repeat Test	Resistant*	Resistant*	Susceptible	Resistant*	Invalid Growth Control, Repeat Test

*All resistant results should be confirmed by an alternate method prior to reporting.

LIMITATIONS

1. The VersaTREK Myco Streptomycin susceptibility test does not interpret the degree of susceptibility of the isolate being tested. It is a qualitative test.
2. The VersaTREK Myco Streptomycin susceptibility test can only be performed on the VTI or ESP instruments. Testing cannot be performed manually.
3. Use only pure cultures of *M. tuberculosis*. The user must confirm the purity of the culture, especially if the result is resistant. Cultures that contain multiple species of Mycobacteria may give erroneous results.
4. Failure to prepare the isolates per the manufacturer's recommendation may lead to inaccurate results.
5. Failure to re-hydrate the streptomycin with the proper volume of sterile water may give inaccurate results.
6. Thorough mixing of inoculated bottles is important. Failure to mix adequately may lead to false resistant results.
7. Failure to use the VersaTREK Myco GS growth supplement may lead to false susceptible results.

QUALITY CONTROL

A new lot number or shipment of VersaTREK Myco Streptomycin should be tested with the quality control organism *M. tuberculosis* ATCC 25618 (streptomycin susceptible). Expected results are shown in Table 4. Quality control should be run once each week when susceptibility testing is performed. Observation of the proper results, within 4-13 days, indicated the reagents are ready for use in testing patient isolates.

If proper results are not observed, do not report patient's results. Repeat quality control and any patient isolates affected by the initial quality control failure. If repeat quality control does not perform as expected, do not report patient results. Do not use the product until you have contacted Technical Services.

1. Add 1 ml of VersaTREK Myco GS to VersaTREK Myco culture bottles.
2. Rehydrate lyophilized VersaTREK Myco Streptomycin with sterile water, and prepare the 5 ml to 15 ml dilution, as described under "Inoculation of VersaTREK Myco Culture Bottles for Susceptibility Testing".
3. Add 1.0 ml of the 120 µg/ml drug concentration to a VersaTREK Myco bottle. The final streptomycin concentration in the Myco culture bottle is 8 µg/ml.
4. Add 1.0 ml of the 30 µg/ml drug concentration to a second VersaTREK Myco bottle. The final streptomycin concentration in the Myco culture bottle is 2 µg/ml.
5. Add 1.0 ml of sterile distilled or deionized water to the growth control bottle.
6. Add 0.5 ml of the 1:10 dilution of culture from a positive VersaTREK Myco seed bottle to the appropriate culture bottles containing drug and to the drug-free growth control bottle.
7. After observation of expected results, use the remainder of the lot in testing specimens. If expected results are not achieved, contact Technical Support.

Table 4: QC Strain Expected Results

Organism	ATCC	Streptomycin
M. tuberculosis	25618	Susceptible

The most common causes of quality control failure are over-inoculation of the streptomycin test sets and contamination. If repeated false resistance results are obtained, the streptomycin antibiotic most likely has lost activity. The recommendation is to test with a new antibiotic stock.

EXPECTED RESULTS

Initial testing of 109 clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* was performed for susceptibility to streptomycin at 4 diverse sites using the Modified Agar Proportions (MAP) Method[4] and VersaTREK Myco Streptomycin Test. Both systems detected 95 (87.2%) susceptible strains. The MAP method detected 6 high resistant strains (resistant to 10 µg/ml streptomycin), and 14 low resistant strains (resistant to 2 µg/ml concentration of streptomycin). The VersaTREK Streptomycin test detected 5 high-resistant, and 11 low-resistant strains. The initial testing was performed with only one concentration (8 µg/ml) of streptomycin, which was found to be inconsistent in detecting low streptomycin resistant strains.

An additional concentration of 2 µg/ml was added to the test, and this was tested with 14 *M. tuberculosis* clinical strains, and 30 CDC challenge strains at three sites. This testing showed good correlation in detecting low resistance to streptomycin.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Table 5. Clinical Study Results with the VersaTREK/ESP Culture System II Compared to the Modified Agar Proportion Method (MAP)

Drug	MAP			VersaTREK/ESP Culture System II				
					Susceptible Strains		Resistant Strains	
	Concentration	#S	#R	Equivalent Concentration	# Agreement	% Agreement	# Agreement	% Agreement
Streptomycin	2 µg/ml	95	14	2 µg/ml	95	100	11	79
	10 µg/ml	103	6	8 µg/ml	103	100	5	83

Table 6. Ten Clinical (30 tests) and 30 CDC Challenge Strains (60 tests) of *M. tuberculosis* tested at two or three sites with 2 concentrations of Streptomycin

(The data are represented as total number of data points tested.)

Drug	MAP			VersaTREK/ESP Culture System II				
					Susceptible Strains		Resistant Strains	
	Concentration	#S	#R	Equivalent Concentration	# Agreement	% Agreement	# Agreement	% Agreement
Streptomycin	2 µg/ml	72	18	2 µg/ml	72	100	18	100
	10 µg/ml	77	13	8 µg/ml	77	100	13	100

HAZARD INFORMATION

Xn Harmful
R22 Harmful if swallowed.
R61 May cause harm to the unborn child.
S37 Wear suitable gloves.
S53 Avoid exposure – obtain special instructions before use.

REFERENCES

1. Stratton, C.W. 1992. The resurgence of tuberculosis. Inf. Dis. Newsl. 11:73-80.
2. Tenover, F.C., J.T. Crawford, R.E. Huebner, L.J. Geiter, C.R. Horsberg, Jr., and R.C. Good. 1993. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? J. Clin. Microbiol. 31:767-770.
3. CDC/National Institutes of Health, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th Edition Atlanta: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC and NIH, 1999; DHHS publication no. (CDC) 93-8395.
4. Strong, B. E., and G. P. Kubica. 1981. Isolation and Identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A Guide for the Level II Laboratory. US Publication no.81-9390. Centers for Disease Control, Atlanta, GA.

For additional information call TREK Technical Support at 1.800.642.7029 or or 1.216.351.8735.



TREK Diagnostic Systems
982 Keynote Circle, Suite 6
Cleveland, Ohio 44131
USA
800.871.8909
www.trekds.com

EC REP

TREK Diagnostic Systems
Units 17 – 19, Birches Industrial Estate
East Grinstead
West Sussex, RH19 1XZ
UK

L-TDST020-5
2010-07

Español

VersaTREK® Myco Streptomycin, 7120-30

USO
La prueba VersaTREK Myco Streptomycin es un procedimiento rápido y cualitativo para las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis*, desde el cultivo, hasta la estreptomicina. VersaTREK Myco Streptomycin se utiliza junto con VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) y ESP® Culture System II (ESP).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN
Diagnosticar rápidamente la tuberculosis es importante para iniciar un tratamiento farmacológico adecuado y establecer las medidas para prevenir la propagación de esta enfermedad altamente contagiosa. El retraso en el tratamiento, especialmente de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos (MDR-TB), puede conllevar el fracaso de éste y la muerte del paciente.[1] Para tratar estos casos se requiere que los microbiólogos clínicos utilicen las pruebas de diagnóstico más sensibles y rápidas que proporcionen resultados fiables. Expertos del CDC han hecho varias recomendaciones respecto a las pruebas micobacterianas, incluido el uso de medios líquidos y sólidos para cultivos micobacterianos. [2]

En las pruebas de susceptibilidad de estreptomicina de *M. tuberculosis*, el sistema VTI/ESP combina un medio de cultivo líquido (VersaTREK Myco Broth), un suplemento de crecimiento (VersaTREK Myco GS), y concentraciones específicas de estreptomicina con un sistema de detección que incuba automáticamente y monitoriza continuamente los cultivos inoculados con aislamientos de *M. tuberculosis* provinentes de diversas muestras. Las esponjas de los frascos de VersaTREK Myco proporcionan una matriz de soporte al crecimiento e incrementan el área de superficie expuesta al oxígeno del espacio de aire. La tecnología del sistema VTI/ESP se basa en la detección de cambios en la presión del espacio de aire dentro de un frasco cerrado causados por el crecimiento microbiano. Se ha desarrollado un algoritmo especial para la detección de microbacterias de crecimiento muy lento.

En el sistema VTI/ESP, el fármaco antituberculoso estreptomicina se puede inyectar en frascos VersaTREK Myco complementados con VersaTREK Myco GS. Un inóculo de un cultivo confirmado de *M. tuberculosis* desarrollado a partir de un frasco de cultivo se añade a un frasco de control sin fármacos, usado como control positivo, y a un frasco de prueba que contiene estreptomicina. Si el organismo es susceptible al fármaco, se detectará un crecimiento retrasado o no microbiano. Si el organismo es resistente a la estreptomicina, se detectará un crecimiento microbiano con la generación de una curva que muestra una excursión descendiente a partir de la línea base. El tiempo para detectar el frasco sin fármaco determina la finalización de la prueba. El fármaco usado en este sistema es estreptomicina, que se hidrata con agua estéril hasta conseguir una concentración crítica específica. Las concentraciones de fármacos específicas para este fármaco son 2 µg/ml y 8 µg/ml.

La detección de crecimiento bacteriano en el sistema VTI/ESP se basa en la medida sensible de la producción o del consumo de gas dentro del espacio de aire de un frasco de cultivo cerrado. Esta información se usa para generar una curva de presión para cada frasco. Con un algoritmo interno se analiza la información para determinar el estado de cada muestra de la prueba. Cuando se reúne un conjunto de condiciones, el frasco se marca como positivo. Hay aproximadamente 10^6 CFU/ml de microbacterias en el momento de la detección.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO
La prueba de susceptibilidad de las muestras de *M. tuberculosis* se realiza con el sistema VTI/ESP inoculando una suspensión de organismos en frascos de VersaTREK Myco Broth complementados con VersaTREK Myco GS y VersaTREK Myco Streptomycin. Se acompaña VersaTREK Connector a cada frasco para establecer un sistema cerrado de monitorización del frasco con el instrumento VTI/ESP. Una membrana hidrofóbica en el VersaTREK Connector previene la aerosolización.

Se introduce la información del aislamiento en el ordenador del sistema y los frascos se colocan en el instrumento para incubarse a 35 – 37 ºC bajo condiciones estacionarias. El sistema VTI/ESP detecta crecimiento microbacteriano al monitorizar continuamente (cada 24 minutos) el índice de consumo de oxígeno en el espacio de aire del frasco de cultivo e informa de la respuesta de crecimiento con una señal positiva. Al final del periodo de incubación específico, según determina el frasco de control sin fármaco para cada aislamiento que se analiza, se determina manualmente si el aislamiento es susceptible o resistente al fármaco.

REACTIVOS
VersaTREK Myco Streptomycin contiene un vial de estreptomicina liofilizada. El vial se tiene que rehidratar con 25 ml de agua estéril destilada o desionizada.

FÓRMULA DE REHIDRATACIÓN *

(H2O)	Agua procesada	25 ml
(STR)	Estreptomicina	0,012% w/v
(SA)	Agente solubilizante	1,25% w/v

*Ajustada para reunir los criterios de funcionamiento.

PRECAUCIONES

1. Uso para diagnóstico *in vitro*.
2. Para obtener más información sobre el riesgo consulte las hojas de información de seguridad.
3. ATENCIÓN: MUESTRA DE PRUEBA POTENCIALMENTE INFECCIOSA. Siga las precauciones generales y la política institucional al manipular y tratar agentes infecciosos.
4. En el manejo de cultivos de *M. tuberculosis* se recomiendan las prácticas, equipo de contención e instalaciones del nivel de Bioseguridad 3[3]
5. VersaTREK Connector contiene una aguja afilada empotrada que es estéril al quitar el sello, pero al acabar de utilizarla está contaminada.
6. Inspeccione visualmente todos los frascos por si están contaminados o hay grietas u otras señales de deterioro. No utilice frascos que parezcan turbios o agrietados.
7. Utilice únicamente jeringas con cierre para aguja.
8. Esterilice todos los frascos VersaTREK Myco antes de utilizarlos.

ALMACENAMIENTO

Almacénelos a 2-8°C. Protéjalos de la luz. Después de la rehidratación, almacénelos a 2-8°C y utilícelos en 4 semanas, o congélelos a -20°C y utilícelos en 3 meses. Una vez descongelados no los vuelva a congelar.

FECHA DE CADUCIDAD

La fecha de caducidad se aplica al producto en su envase intacto (sin abrir) cuando se almacena. Laprueba VersaTREK Streptomycin no debe utilizarse después de la fecha de caducidad indicada.

PROCEDIMIENTO: PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DE *M. tuberculosis* USANDO VERSATREK/ESP CUTLURE SYSTEM II

Materiales proporcionados:

VersaTREK Myco Streptomycin	7120-30
VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Connectors	7150-44

Materiales necesarios pero no proporcionados:

Agua estéril destilada o desionizada
Autoclave
Middlebrook 7H10 u otro medio micobacteriano de agar o con base de huevo, para controles de pureza.
Incubadora de CO_2, 37ºC
Asas estériles
Jeringas de tuberculina estériles con agujas permanentes.
Desinfectantes micobacterianos (Ej. Amphly™, OMNI™, etc.)
Hisopos con alcohol
Mezclador de vórtice
Gabinete de seguridad biológica
Microscopio
Materiales para teñir muestras
Organismo de control de calidad; *M. tuberculosis* ATCC® 25618

Inoculación de frascos de cultivo VersaTREK Myco para pruebas de susceptibilidad Myco

1. Etiquete cada frasco de cultivo VersaTREK Myco con información que la identifique. En las pruebas de estreptomicina se usarán 3 frascos por prueba.

2. Desinfecte los tapones del frasco de cultivo con alcohol.

3. Añada asépticamente **1,0 ml** de VersaTREK Myco GS a cada frasco de cultivo inyectándolo a través del tabique con una aguja y una jeringa.

4. Rehidrate la estreptomicina liofilizada VersaTREK Myco añadiendo asépticamente 25 ml de agua estéril destilada o desionizada. Se produce una concentración de fármaco de 120 µg/ml.

5. Extraiga asépticamente 5 ml de la solución y transfiéralos a un envase estéril. Añada 15 ml de agua estéril destilada o desionizada. Se produce una concentración de fármaco de 30 µg/ml.

6. Añada asépticamente **1,0 ml** de la concentración de 120 µg/ml a un frasco de cultivo inyectándolo a través del tabique con una aguja y una jeringa. La concentración final de estreptomicina en el frasco de cultivo Myco es 8 µg/ml.

7. Añada asépticamente **1,0 ml** de la concentración de 30 µg/ml a un frasco de cultivo inyectándolo a través del tabique con una aguja y una jeringa. La concentración final de estreptomicina en el frasco de cultivo Myco es 2 µg/ml.

TABLA 1: preparación del fármaco antituberculoso

Fármaco y concentración final en los frascos VersaTREK Myco	**Cantidad de diluyente añadida a la estreptomicina liofilizada**	**Concentración después de la rehidratación**	**Diluciones adicionales**	**Concentración para inyectar en los frascos de la prueba**	**Número de pruebas por vial**
Estreptomicina 8,0 µg/ml	25 ml	120 µg/ml	No	120 µg/ml	20
Estreptomicina 2,0 µg/ml		⇓⇒	5 ml de fármaco diluido más 15 ml de agua	30 µg/ml	20

8. Para el frasco de control sin fármaco añada **1,0 ml** de agua estéril destilada o desionizada. Con un único vial se pueden realizar 20 pruebas.

9. El inóculo de una muestra para pruebas de susceptibilidad debe confirmarse como cultivo puro de *M. tuberculosis* antes de las pruebas con estreptomicina y debe prepararse así:
   a) **Suspensión de células equivalentes a McFarland** - Los aislamientos puros (de menos de 4 ó 5 semanas) que crezcan en un medio agar micobacteriano apropiado (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11, medios Lowenstein-Jensen) se consiguen usando una asa estéril y se colocan en un tubo con aproximadamente 9 a 10 ml de agua estéril destilada o desionizada y perlas de vidrio. Se agita el tubo y se deja sedimentar durante 15 minutos. Se extraen aproximadamente 5 ml de la capa superior, que se colocan en un tubo de prueba estéril y se ajustan al equivalente nº 1 de McFarland (aproximadamente $3,0 \times 10^{7}$ CFU/ml) usando agua estéril destilada o desionizada.

   b) **Frasco de cultivo VersaTREK Myco** - Prepare un equivalente nº 1 de McFarland a partir de una fuente agar o líquida (crecimiento de Middlebrook 7H9) del aislamiento de la prueba. Inyecte asépticamente 0,5 ml de esta dilución en un frasco de cultivo VersaTREK Myco complementado con 1,0 ml de VersaTREK Myco GS. Se coloca un VersaTREK Connector sobre el frasco y éste se incuba en el instrumento hasta que se observa una señal positiva (10^{6} CFU/ml aprox.). Al observarse la señal positiva, se extrae el VersaTREK Connector y se agita el frasco durante 1 ó 2 minutos. El inóculo del frasco de cultivo debe utilizarse durante las 72 horas posteriores a la señal positiva.

10. Realice una dilución 1:10 del McFarland nº 1 de agar o del frasco de cultivo VersaTREK Myco en sal o agua destilada estéril (inóculo para la prueba). Añada 0,5 ml a cada caldo de control y de prueba.

11. Limpie los frascos de cultivo y los tapones con un desinfectante micobactericida.

12. Mezcle todos los frascos invirtiéndolos varias veces.

13. Quite el sello de la parte inferior del VersaTREK Connector. Presione el final de la aguja del VersaTREK Connector a través del tapón del frasco de cultivo. AVISO: no invierta el cultivo mientras el VersaTREK Connector esté encima. El fluido de la aguja puede interferir con las lecturas de presión del frasco.

14. Coloque el frasco de cultivo con el VersaTREK Connector en el instrumento. Para obtener más información sobre el acceso al frasco, consulte el manual técnico del sistema VersaTREK/ESP.

    Sugerencia de carga: si el número de muestra es “123”, numere los frascos de la prueba de estreptomicina con números como 123CP para el control positivo, y 123S2 y 123S8 para los caldos de prueba de estreptomicina. De esta manera, todos los frascos asociados con este número de muestra podrán buscarse y ser localizadas como grupo.

15. Un método alternativo para añadir reactivos e inóculos a los frascos de cultivo es extraer la tapa y el tapón y realizar las adiciones usando una pipeta estéril. Se requiere cerrar la tapa y el tapón con cuidado.

RESULTADOS

Para la prueba de susceptibilidad con VersaTREK/ESP Culture System II, un aislamiento se interpreta como susceptible o resistente a un fármaco según lo siguiente (redondee los momentos de detección al día más cercano):

1. después de que el frasco sin fármaco haya dado positivo, anote el momento de detección (en la gráfica del frasco de prueba).

2. Tres días adicionales, redondeados al número completo más próximo, de incubación después de que el control sin fármaco haya dado positivo, busque y anote los resultados de los otros frascos de la prueba para el aislamiento.

3. **Susceptible**: un aislamiento en un frasco con fármaco que no ha dado señales en el periodo de detección de tres días del control sin fármaco se considera susceptible a esa concentración de fármaco. El crecimiento después de tres días, redondeados al número completo más próximo, del frasco de control del crecimiento que da positivo no debe tenerse en cuenta porque no se considera un indicador de resistencia. Para redondear hasta el número entero más cercano, si el tiempo es ≤ XX.49 se redondea a la baja y si el tiempo es ≥ XX.50 se redondea al alta.

4. **Resistente:** El tiempo de detección de la botella del fármaco es de ± tres días (redondeado hasta el número entero más cercano) del tiempo de detección de la botella de control libre de fármaco (redondeado hasta el número entero más cercano). Para redondear hasta el número entero más cercano, si el tiempo es ≤ XX.49 se redondea a la baja y si el tiempo es ≥ XX.50 se redondea al alta.

   NOTA:
   - Ninguna botella deberá marcar positiva antes del tercer día. Las botellas que marcan positivas antes de tres días o están contaminadas o bien el inóculo es demasiado alto. La prueba debería ser repetida.
   - Una botella puede señalizar antes que la botella de control (ver el ejemplo D en la Tabla 3).

   Todos los resultados de resistencia deben confirmarse con un método alternativo antes de considerarlos definitivos.

Los frascos que den positivo deben teñirse para AFB (Acid Fast Bacilli) y subcultivarse en una placa Middlebrook 7H10 ó 7H11 agar, así como en una placa agar no selectiva (p.ej. agar sangre) para asegurar la pureza de la muestra. Los frascos de control del crecimiento que den señales en menos de 2,5 días pueden indicar la presencia de un contaminante no micobacteriano, mientras que los frascos de control que no den señal en 10 días después de ser inoculadas pueden ser indicio de una preparación incorrecta del frasco. En ambos casos la muestra debe volver a analizarse.

Revise siempre la gráfica del aislamiento antes considerarla definitiva. Si tiene dudas sobre los análisis de gráficas, consulte el manual técnico. Si las gráficas de las pruebas que han dado positivo parecen anormales, contacte con el soporte técnico de TREK en el 1-216-351-8735.

TABLA 2: observaciones y evaluación de la prueba

Frasco de la prueba	Resultados obtenidos	Posible causa	Acción
Control de crecimiento	<3 días desde la inoculación	Posible contaminante o inóculo demasiado fuerte; compruebe la pureza de las placas y gráficas.	REPETIR PRUEBA
Control de crecimiento*	>10 días desde la inoculación	Organismo no viable, inóculo demasiado débil	REPETIR PRUEBA
Control de crecimiento	Crecimiento detectado entre 3 y 10 días después de la inoculación		Prueba válida - evalúe los frascos con fármaco
Control de pureza	No se observan contaminantes, al menos en 18 h sobre una placa de agar sangre.		Prueba válida
	Se observan organismos no AFB	El cultivo no era puro	REPETIR PRUEBA
	No se observan variaciones coloniales en las placas de agar Middlebrook.		Prueba válida- sin acción
	Se observa una variación colonial en las placas de agar Middlebrook.	Hay más de una especie de micobacteria presente	REPETIR PRUEBA para verificar los resultados; informe al médico de que los resultados finales están pendientes

*El índice superior de 10 días de tiempo de detección para el control de crecimiento se ha establecido a partir de datos clínicos e internos.

Asegúrese de comprobar los resultados de los subcultivos con el agar micobacteriano para verificar que sólo había una especie de micobacteria, especialmente en el caso de un resultado resistente.

TABLA 3: Ejemplos de resultados para el cálculo de susceptibilidad de las cepas de *M. tuberculosis* a VersaTREK Myco Streptomycin

Paciente	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**
Control de estreptomicina Positivo (días)	2	4	5	9	10	10	12
Fármaco de estreptomicina Positivo (días)	5	2	6	7	14	13	10
Resultado	Control de crecimiento inválido. Repetir prueba	Inválido. Repetir prueba	Resistente*	Resistente*	Susceptible	Resistente*	Control de crecimiento inválido. Repetir prueba

*Todos los resultados de resistencia deberán ser confirmados mediante un método alternativo antes de ser informados.

LIMITACIONES

1. La prueba de susceptibilidad VersaTREK Myco Streptomycin no interpreta el grado de susceptibilidad del aislamiento que se analiza. Es una prueba cualitativa.

2. La prueba de susceptibilidad VersaTREK Myco Streptomycin sólo se puede realizar con los instrumentos VTI o ESP. La prueba no se puede realizar manualmente.

3. Utilice únicamente cultivos puros de *M. tuberculosis*. El usuario debe confirmar la pureza del cultivo, especialmente si el resultado es resistente. Los cultivos que contengan especies múltiples de micobacterias pueden dar resultados erróneos.

4. Si no se prepara el aislamiento según las recomendaciones del fabricante pueden generarse resultados erróneos.

5. Si no se rehidrata la estreptomicina con la cantidad adecuada de agua estéril pueden generarse resultados erróneos.

6. Mezclar totalmente los frascos inoculados es importante. Si no se mezclan adecuadamente pueden generarse resultados resistentes falsos.

7. Si no se utiliza el suplemento VersaTREK Myco GS pueden generarse resultados susceptibles falsos.

CONTROL DE CALIDAD

Un nuevo número o envío de lote de VersaTREK Myco Streptomycin debe analizarse con el organismo de control de calidad *M. tuberculosis* ATCC 25618 (susceptible a la estreptomicina). Los resultados esperados se muestran en la tabla 4. El control de calidad debe realizarse una vez por semana cuando se lleven a cabo pruebas de susceptibilidad. La observación de los resultados adecuados, en 4 a 13 días, indican que los reactivos están listos para usarse en las pruebas con aislamientos de pacientes.

Si no se observan resultados adecuados, no informe de los resultados del paciente. Repita el control de calidad y los aislamientos de pacientes afectados por el error inicial en el control de calidad. Si la repetición del control de calidad no sale como estaba previsto, no informe de los resultados del paciente. No utilice el producto hasta que haya contactado con el Servicio técnico.

1. Añada 1 ml de VersaTREK Myco GS a los frascos de cultivo VersaTREK Myco.

2. Rehidrate el VersaTREK Myco Streptomycin liofilizado con agua estéril, y prepare una dilución de 5 ml a 15 ml, según se describe en “Inoculación de los frascos de cultivo VersaTREK Myco para pruebas de susceptibilidad".

3. Añada 1,0 ml de la concentración de fármaco de 120 µg/ml a un frasco VersaTREK Myco. La concentración final de estreptomicina en el frasco de cultivo Myco es 8 µg/ml.

4. Añada 1,0 ml de la concentración de fármaco de 30 µg/ml a un segundo frasco VersaTREK Myco. La concentración final de estreptomicina en el frasco de cultivo Myco es 2 µg/ml.

5. Añada 1,0 ml de agua estéril destilada o desionizada al frasco de control del crecimiento.

6. Añada 0,5 ml de la dilución 1:10 de cultivo desde un frasco positivo VersaTREK Myco a los frascos de cultivo apropiados que contienen fármaco y al frasco de control del crecimiento sin fármaco.

7. Después de observar los resultados esperados, utilice el lote restante para analizar las muestras. Si no se consiguen los resultados esperados, contacte con el soporte técnico.

8.

Tabla 4: resultados esperados del control de calidad

Organismo	ATCC	Estreptomicina
M. tuberculosis	25618	Susceptible

Las causas más comunes de error en el control de calidad son la sobreinoculación de los conjuntos de pruebas de estreptomicina y la contaminación. Si se vuelven a obtener resultados falsos de resistencia, el antibiótico de estreptomicina probablemente haya perdido actividad. Se recomienda hacer las pruebas con reservas nuevas del antibiótico.

RESULTADOS ESPERADOS

Se realizaron pruebas iniciales de 109 cepas clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* para comprobar la susceptibilidad a la estreptomicina en 4 lugares diferentes usando el método de proporciones de agar modificadas (MAP)[4] y VersaTREK Myco Streptomycin Test. Ambos sistemas detectaron 95 (87,2%) cepas susceptibles. El método MAP detectó 6 cepas altamente resistentes (resistentes a 10 µg/ml de estreptomicina), y 14 cepas ligeramente resistentes (resistentes a una concentración de 2 µg/ml de estreptomicina). La prueba VersaTREK Streptomycin detectó 5 cepas altamente resistentes y 11 ligeramente resistentes. La prueba inicial se realizó con sólo una concentración (8 µg/ml) de estreptomicina, que se mostró inconsistente para detectar cepas poco resistentes a la estreptomicina.

Se añadió a la prueba una concentración adicional de 2 µg/ml, que fue analizada con 14 cepas clínicas de *M. tuberculosis*, y 30 cepas CDC en tres lugares. Esta prueba mostró una buena correlación para detectar resistencias ligeras a la estreptomicina.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Tabla 5. Resultados del estudio clínico con VersaTREK/ESP Culture System II Comparado con el método de proporción agar modificada (MAP)

Fármaco	MAP			VersaTREK/ESP Culture System II				
					Cepas susceptibles		Cepas resistentes	
	Concentración	N.ºS	N.ºR	Concentración equivalente	N.º de Acuerdos	% Acuerdo	N.º de Acuerdos	% Acuerdo
Estreptomicina	2 µg/ml	95	14	2 µg/ml	95	100	11	79
	10 µg/ml	103	6	8 µg/ml	103	100	5	83

Tabla 6. Diez cepas clínicas (30 pruebas) y 30 cepas CDC (60 pruebas) de *M. tuberculosis* se analizaron en dos o tres lugares con 2 concentraciones de estreptomicina.
(Los datos están representados como número total de puntos de datos analizados.)

Fármaco	MAP			VersaTREK/ESP Culture System II				
					Cepas susceptibles		Cepas resistentes	
	Concentración	N.ºS	N.ºR	Concentración equivalente	N.º de Acuerdos	% Acuerdo	N.º de Acuerdos	% Acuerdo
Estreptomicina	2 µg/ml	72	18	2 µg/ml	72	100	18	100
	10 µg/ml	77	13	8 µg/ml	77	100	13	100

RIESGOS ESPECÍFICOS

Xn Nocivo
R22 Nocivo por ingestión.
R61 Posible riesgo de daño a los nonatos.
S37 Utilice los guantes apropiados.
S53 Evite la exposición y procure disponer de las instrucciones especiales antes de su utilización.

BIBLIOGRAFÍA: pg. 7

Para obtener información adicional, llame al Servicio de Asistencia Técnica de TREK Diagnostic Systems al número 1-216-351-8735.

Italiano

VersaTREK® Myco Streptomycin, 7120-30

USO PREVISTO
Il test VersaTREK Myco Streptomycin è una rapida procedura qualitativa che consente di verificare *in vitro* la sensibilità delle colture di *Mycobacterium tuberculosis* alla streptomicina. Il test VersaTREK Myco Streptomycin viene utilizzato con i sistemi VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) ed ESP® Culture System II (ESP).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE
Una diagnosi tempestiva della tubercolosi è estremamente importante per l'avvio di un'adeguata terapia farmacologica e per l'adozione di misure che prevengano la diffusione di una malattia così contagiosa. Un ritardo nel trattamento, specialmente dei ceppi di *M. tuberculosis* multifarmaco-resistente (MDR-TB), può determinare un insuccesso terapeutico e compromettere persino la sopravvivenza del paziente.[1] Per risolvere questi problemi, i microbiologi clinici vengono sollecitati a utilizzare i test diagnostici più rapidi e sensibili, che consentano di ottenere risultati veramente affidabili. Negli Stati Uniti, gli esperti del CDC (Centers for Disease Control) hanno formulato diverse raccomandazioni riguardo ai test micobatterici, compreso l'uso di terreni di coltura sia liquidi che solidi per i micobatteri.[2]

Per il test di sensibilità del *M. tuberculosis* alla streptomicina, il sistema VTI/ESP si basa su una combinazione tra un dispositivo di rilevamento automatico e un terreno di coltura liquido (VersaTREK Myco Broth), un integratore di crescita (VersaTREK Myco GS) e determinate concentrazioni di streptomicina. Il sistema incuba e controlla continuamente le colture inoculate con isolati di *M. tuberculosis* provenienti da svariati campioni sorgente. Le spugne presenti nei flaconi VersaTREK Myco forniscono una matrice di supporto alla crescita e aumentano la superficie esposta all'ossigeno dello spazio di testa. La tecnologia del sistema VTI/ESP si basa sul rilevamento delle variazioni di pressione dello spazio di testa, determinate dalla crescita batterica all'interno di un flacone sigillato. È stato inoltre sviluppato uno speciale algoritmo per il rilevamento dei micobatteri dalla crescita particolarmente lenta.

Con il sistema VTI/ESP, il farmaco antitubercolare streptomicina può essere iniettato nei flaconi VersaTREK Myco integrati con VersaTREK Myco GS. Un inoculo di *M. tuberculosis* proveniente da un flacone di coltura viene aggiunto sia a un flacone di controllo senza farmaco, utilizzato come controllo positivo, che a un flacone di test contenente streptomicina. Se il microrganismo è sensibile al farmaco, verrà rilevata una crescita ritardata o una mancata crescita. Se invece il microrganismo è resistente alla streptomicina, verrà rilevata una crescita batterica mediante la generazione di una curva che presenta un'escursione discendente rispetto alla linea di base. Il tempo di rilevamento nel flacone senza farmaco corrisponde alla stessa durata del test e ne determina perciò la conclusione. Il farmaco utilizzato in questo sistema è streptomicina idratata con acqua sterile, in specifiche concentrazioni di base, pari a 2 µg/ml e 8 µg/ml.

Il rilevamento della crescita batterica nel sistema VTI/ESP si basa sulla misurazione sensibile della produzione e/o del consumo di gas all'interno dello spazio di testa di un flacone di coltura. Queste informazioni vengono utilizzate per generare una curva di pressione per ciascun flacone. Un algoritmo interno analizza le informazioni per determinare lo stato di ciascun campione del test. Quando si verifica una specifica serie di condizioni, il flacone in questione viene contrassegnato come positivo. Al momento del rilevamento il numero di micobatteri è di circa 10^6 CFU/ml.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA
Il test di sensibilità del *M. tuberculosis* viene effettuato con il sistema VTI/ESP, inoculando una sospensione di microrganismi nei flaconi per brodo di coltura VersaTREK Myco, già integrati con VersaTREK Myco GS e VersaTREK Myco Streptomycin. A ciascun flacone viene collegato un connettore VersaTREK Connector, in modo da configurare un sistema chiuso per il monitoraggio del flacone con lo strumento VTI/ESP. Una membrana idrofobica, presente nel connettore VersaTREK Connector, impedisce l'aerosolizzazione.

Le informazioni sull'isolato vengono immesse nel computer del sistema e i flaconi vengono collocati nello strumento per un'incubazione a 35 – 37 ºC in condizioni stazionarie. Il sistema VTI/ESP rileva la crescita micobatterica monitorando continuamente (ogni 24 minuti) il tasso di consumo di ossigeno all'interno dello spazio di testa del flacone di coltura. Tale risposta di crescita viene indicata con un segnale positivo. Al termine del periodo di incubazione previsto, come determinato dal flacone di controllo senza farmaco per ciascun isolato esaminato, l'isolato viene contrassegnato manualmente come sensibile o resistente al farmaco.

REAGENTI
VersaTREK Myco Streptomycin contiene una fiala di streptomicina liofilizzata. La fiala deve essere reidratata con 25 ml di acqua distillata o deionizzata sterile.

FORMULA DOPO LA REIDRATAZIONE *

(H2O)	Acqua trattata	25 ml
(STR)	Streptomicina	0,012% w/v
(SA)	Agente solubilizzante	1,25% w/v

* Regolata per soddisfare i criteri delle prestazioni.

PRECAUZIONI
1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. Per informazioni complete sui possibili rischi, consultare le schede sulla sicurezza dei materiali.
3. AVVERTENZA! CAMPIONE DI PROVA POTENZIALMENTE INFETTIVO. Seguire le precauzioni universali e le disposizioni della specifica struttura sanitaria in materia di manipolazione e smaltimento degli agenti infettivi.
4. Durante l'utilizzo delle colture di *M. tuberculosis*, si consiglia di seguire il Livello di biosicurezza 3 per le procedure di routine, nonché per le strutture e le apparecchiature di contenimento.[3]
5. Il connettore VersaTREK Connector contiene un ago incassato e appuntito, che è sterile al momento della rimozione dall'involucro sigillato, ma che può essere soggetto a contaminazione durante l'uso.
6. Ispezionare visivamente tutti i flaconi per individuare eventuali incrinature ed altri segni di deterioramento o contaminazione. Non utilizzare flaconi che risultino torbidi o incrinati.
7. Utilizzare esclusivamente siringhe con sistema di blocco dell'ago.
8. Sterilizzare in autoclave tutti i flaconi VersaTREK Myco prima dello smaltimento.

CONSERVAZIONE
Conservare a 2-8 °C. Proteggere dalla luce. Al momento della reidratazione, conservare a 2-8 °C e utilizzare entro 4 settimane oppure congelare a -20°C e utilizzare entro 3 mesi. Una volta effettuato lo scongelamento, non ricongelare.

DATA DI SCADENZA
La data di scadenza riguarda il prodotto presente del contenitore intatto (non aperto) e conservato secondo le istruzioni. Il test VersaTREK Streptomycin non dovrà essere utilizzato oltre la data di scadenza indicata.

PROCEDURA: TEST DI SENSIBILITÀ DEL *M. tuberculosis* MEDIANTE VERSATREK/ESP CULTURE SYSTEM II

Materiali forniti:

VersaTREK Myco Streptomycin	7120-30
VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Connectors	7150-44

Materiali richiesti ma non forniti:
Acqua distillata o deionizzata sterile
Autoclave
Middlebrook 7H10 o altri agar micobatterici o terreni di coltura all'uovo, per i controlli di purezza
Incubatrice a CO_2, 37 ºC
Anse sterili
Siringhe sterili da tubercolina con aghi collegati in modo permanente
Disinfettante antimicobatterico (ad es. Amphly™, OMNI™, ecc.)
Tamponi imbevuti di alcol
Miscelatore a vortice
Cappa di sicurezza biologica
Microscopio
Materiali per la colorazione dei vetrini
Microrganismo per il controllo qualità: *M. tuberculosis* ATCC® 25618

Inoculazione dei flaconi di coltura VersaTREK Myco per il test di sensibilità Myco

1. Etichettare ciascun flacone di coltura VersaTREK Myco con i dati di identificazione. Nel test della streptomicina verranno utilizzati 3 flaconi per ciascun test.

2. Disinfettare i tappi del flacone di coltura con dell'alcol.

3. Aggiungere asetticamente **1,0 ml** di VersaTREK Myco GS a ciascun flacone di coltura, iniettandolo attraverso il setto con un ago e una siringa.

4. Reidratare VersaTREK Myco Streptomycin liofilizzato, aggiungendo asetticamente 25 ml di acqua distillata o deionizzata sterile. Si otterrà così una concentrazione del farmaco pari a 120 µg/ml.

5. Rimuovere asetticamente 5 ml della soluzione e trasferirli in un contenitore sterile. Aggiungere 15 ml di acqua distillata o deionizzata sterile. Si otterrà così una concentrazione del farmaco pari a 30 µg/ml.

6. Aggiungere asetticamente a ciascun flacone di coltura **1,0 ml** della concentrazione del farmaco pari a 120 µg/ml, iniettando il farmaco attraverso il setto con un ago e una siringa. La concentrazione finale di streptomicina presente nel flacone di coltura Myco sarà di 8 µg/ml.

7. Aggiungere asetticamente, a un secondo flacone di coltura, **1,0 ml** della concentrazione del farmaco pari a 30 µg/ml, iniettando il farmaco attraverso il setto con un ago e una siringa. La concentrazione finale di streptomicina presente nel flacone di coltura Myco sarà di 2 µg/ml.

TABELLA 1: Preparazione del farmaco antitubercolotico

Farmaco e concentrazione finale in VersaTREK Myco Bottles	Quantità di diluente aggiunto alla streptomicina liofilizzata	Concentrazione dopo la reidratazione	Diluizioni aggiuntive	Concentrazione da iniettare nei flaconi del test	Numero di test per fiala
Streptomicina 8,0 µg/ml	25 ml	120 µg/ml	No	120 µg/ml	20
Streptomicina 2,0 µg/ml		⇓⇒	5 ml di farmaco diluito più 15	30 µg/ml	20

8. Nel flacone di controllo senza farmaco, aggiungere **1,0 ml** di acqua sterile al posto del farmaco. Con ciascuna fiala è possibile effettuare venti test.

9. Prima di effettuare il test di sensibilità alla streptomicina, l'inoculo di un campione da utilizzare per il test dovrà essere confermato come coltura pura di *M. tuberculosis* e preparato nel modo seguente:
   a) **Sospensione cellulare equivalente McFarland** – Gli isolati puri (non superiori a 4-5 settimane) posti in coltura su un appropriato terreno agar micobatterico (slant con Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11 o Lowenstein-Jensen) vengono prelevati tramite raschiamento con un'ansa sterile e collocati in una provetta contenente circa 9-10 ml di acqua distillata o deionizzata sterile e microsfere di vetro. La provetta viene centrifugata e lasciata depositare per 15 minuti. Circa 5 ml dello strato superiore vengono rimossi, collocati in una provetta sterile e regolati su un equivalente McFarland N. 1 (circa 3,0 x 10^7 CFU/ml), utilizzando acqua distillata o deionizzata sterile.

   b) **Flacone di coltura VersaTREK Myco** – Preparare un equivalente McFarland N. 1 da un terreno sorgente agar o liquido (coltura in Middlebrook 7H9) dell'isolato di prova. Iniettare asetticamente 0,5 ml di questa diluizione in un flacone di coltura VersaTREK Myco integrato con 1,0 ml di VersaTREK Myco GS. Al flacone viene applicato un connettore VersaTREK Connector sterile e il flacone viene incubato nello strumento finché non si osserva un segnale positivo (circa 10^6 CFU/ml). Una volta registrato tale segnale, il connettore VersaTREK Connector viene rimosso e il flacone viene centrifugato per 1-2 minuti. L'inoculo del flacone di coltura dovrà essere utilizzato entro 72 ore dal segnale positivo dello strumento.

10. Effettuare una diluizione 1:10 del McFarland N. 1 dell'agar o del flacone di coltura VersaTREK Myco in soluzione salina o acqua distillata sterile (inoculo per il test). Aggiungere 0,5 ml a ciascun brodo di controllo e di test.

11. Lavare i flaconi di coltura e i relativi tappi con un disinfettante micobattericida.

12. Mescolare tutti i flaconi capovolgendoli più volte.

13. Rimuovere il dispositivo di chiusura ermetica dalla parte inferiore del connettore VersaTREK Connector. Inserire nel tappo del flacone di coltura l'estremità del connettore VersaTREK Connector contenente l'ago. NOTA: non capovolgere il flacone di coltura mentre il connettore si trova sul flacone: il liquido presente nell'ago potrebbe alterare i valori di pressione del flacone.

14. Posizionare nello strumento il flacone di coltura con il connettore VersaTREK Connector. Per ulteriori dettagli sull'inserimento del flacone, consultare il Manuale dell'operatore del sistema VersaTREK/ESP.
    Indicazioni per un miglior caricamento: se il numero d'inventario del campione è "123", si consiglia di assegnare ai flaconi del test della streptomicina dei numeri d'inventario quali 123PC, per il controllo positivo, 123S2 e 123S8 per i brodi di coltura della streptomicina. In questo modo tutti i flaconi associati al numero d'inventario del campione in esame potranno essere facilmente individuati e localizzati come appartenenti allo stesso gruppo.

15. Un metodo alternativo per aggiungere i reagenti e gli inoculi ai flaconi di coltura consiste nel rimuovere il tappo ed il coperchio ed effettuare le aggiunte utilizzando una pipetta sterile. È necessario chiudere attentamente sia il tappo che il coperchio.

RISULTATI
Per i test di sensibilità mediante VersaTREK/ESP Culture System II, un isolato viene interpretato come sensibile o resistente a un determinato farmaco in base a quanto segue (arrotondare tutti i tempi di rilevamento al giorno intero più vicino):

1. Una volta diventato positivo il flacone senza farmaco, registrare il tempo di rilevamento (riportato sul grafico del flacone del test).

2. Dopo altri tre giorni di incubazione (arrotondati al numero intero più vicino), successivi al momento in cui il controllo senza farmaco ha evidenziato un segnale positivo, ricercare e registrare i risultati dell'isolato per gli altri flaconi del test.

3. **Sensibile**: viene definito sensibile alla concentrazione specifica del farmaco un isolato che, presente nello stesso flacone del farmaco, non abbia evidenziato segnali di crescita entro il periodo di rilevamento di tre giorni stabilito per il controllo senza farmaco. Non si dovrà invece tener conto di una crescita che dovesse verificarsi dopo tre giorni (arrotondati al numero intero più vicino) nel flacone del controllo di crescita con segnale positivo, in quanto tale crescita non viene considerata un indice di resistenza. Per l'arrotondamento al numero intero più vicino procedere nel modo seguente: se il tempo è ≤ XX.,49 si arrotonda per difetto se invece ≥ XX,50 si arrotonda per eccesso.

4. **Resistente**: il tempo di rilevazione del flacone di farmaco è ± tre giorni (arrotondato al numero intero più vicino) del tempo necessario per rilevare il flacone di controllo che non contiene farmaco (arrotondato al numero intero più vicino). Per l'arrotondamento al numero intero più vicino procedere nel modo seguente: se il tempo è ≤ XX.,49 si arrotonda per difetto se invece ≥ XX,50 si arrotonda per eccesso.

   NOTA:
   - Nessun flacone deve avere contrassegno positivo prima del terzo giorno. In tal caso i flaconi sono contaminati oppure l'inoculo è troppo grande. È necessario ripetere il test.
   - Il segnale del flacone del test può comparire prima di quello del flacone di controllo (consultare la Tabella 3 esempio D).

   Prima della registrazione dei dati, tutti i risultati di resistenza dovranno essere confermati da un metodo alternativo.

I flaconi che evidenziano segnali positivi dovranno essere colorati come bacilli acidoresistenti (AFB) e posti in sottocoltura sia in una piastra con agar Middlebrook 7H10 o 7H11 che in una piastra con agar non selettivo (ad es. agar sangue) per assicurare la purezza del campione. I flaconi di controllo della crescita che presentano un segnale positivo in meno di 2,5 giorni possono indicare la presenza di un contaminante non micobatterico, mentre i flaconi di controllo che non presentano un tale segnale entro 10 giorni dall'inoculazione potrebbero essere indicativi di una preparazione non corretta del flacone. Per entrambe le situazioni è necessario sottoporre il campione a un nuovo test.

Riesaminare sempre i grafici degli isolati prima di registrare i dati. Per l'analisi dei grafici, consultare il Manuale dell'operatore. Se i grafici dei test con segnali positivi dovessero risultare anormali, contattare l'Assistenza tecnica TREK al numero 1-216-351-8735.

TABELLA 2: Osservazioni e valutazioni dei test

Flacone del test	Risultato ottenuto	Possibile causa	Azione
Controllo di crescita	<3 giorni dall'inoculazione	Possibile presenza di contaminante o inoculo troppo pesante: controllare le piastre e i grafici di purezza.	RIPETERE IL TEST
Controllo di crescita*	>10 giorni dall'inoculazione	Microrganismo non vitale o inoculo troppo leggero	RIPETERE IL TEST
Controllo di crescita	Crescita rilevata tra i 3 e i 10 giorni dall'inoculazione		Test valido: valutare i flaconi del farmaco
Controllo di purezza	Nessun contaminante osservato per almeno 18 h sulla piastra con agar sangue		Test valido
	Osservati organismi non AFB	La coltura si è rivelata impura	RIPETERE IL TEST
	Nessuna variazione delle colonie osservata sulle piastre con agar Middlebrook		Test valido: nessuna azione
	Variazione delle colonie osservata sulle piastre con agar Middlebrook	Presenza di più specie di micobatteri	RIPETERE IL TEST per verificare i risultati. Notificare al medico che i risultati finali sono in attesa di elaborazione

*Il limite massimo di 10 giorni per il tempo di rilevamento del controllo di crescita è stato stabilito in base a dati risultanti da test clinici e interni.

Assicurarsi di controllare i risultati delle sottocolture sull'agar micobatterico per verificare che sia presente una sola specie di micobatterio, specialmente nei casi di resistenza.

TABELLA 3: esempi dei risultati per il calcolo della suscettibilità dei ceppi di *M. tuberculosis* a VersaTREK Myco Streptomycin

Paziente	A	B	C	D	E	F	G
Controllo positivo, streptomicina (giorni)	2	4	5	9	10	10	12
Farmaco positivo, streptomicina (giorni)	5	2	6	7	14	13	10
Risultato	Controllo della crescita non valida, ripetere il test	Non valido, ripetere il test	Resistente*	Resistente*	Sensibile	Resistente*	Controllo della crescita non valida, ripetere il test

*Prima della registrazione dei dati, tutti i risultati di resistenza dovranno essere confermati da un metodo alternativo.

LIMITAZIONI

1. Il test di sensibilità VersaTREK Myco Streptomycin non indica il grado di sensibilità dell'isolato esaminato, ma è esclusivamente un test qualitativo.

2. Il test di sensibilità VersaTREK Myco Streptomycin può essere eseguito unicamente sugli strumenti VTI ed ESP. Non è possibile effettuare il test manualmente.

3. Utilizzare esclusivamente colture pure di *M. tuberculosis*. L'utente dovrà confermare la purezza delle colture, specialmente se i risultati indicano resistenza. Le colture che contengono più specie di micobatteri potrebbero fornire risultati errati.

4. Una preparazione degli isolati non conforme alle raccomandazioni del produttore potrebbe determinare risultati imprecisi.

5. La mancata reidratazione della streptomicina con il corretto volume di acqua sterile potrebbe fornire risultati imprecisi.

6. È importante miscelare accuratamente i flaconi inoculati. Una miscelazione inadeguata potrebbe determinare risultati di falsa resistenza.

7. Il mancato utilizzo dell'integratore di crescita VersaTREK Myco GS potrebbe fornire risultati di falsa sensibilità.

CONTROLLO QUALITÀ

Un nuovo lotto o stock di VersaTREK Myco Streptomycin dovrà essere sottoposto a test con il microrganismo del controllo qualità: il bacillo *M. tuberculosis* ATCC 25618 (sensibile alla streptomicina). Nella Tabella 4 sono riportati i risultati previsti. Il controllo qualità dovrà essere effettuato una volta alla settimana, in concomitanza con il test di sensibilità. Il verificarsi dei risultati previsti entro 4-13 giorni indicherà che i reagenti sono pronti per l'uso nei test sugli isolati del paziente.

Se i risultati non rientrano nella norma, non riportarli nel referto del paziente. Ripetere il controllo qualità esaminando tutti gli isolati del paziente interessati dal risultato anomalo del controllo qualità. Se neanche la ripetizione del controllo qualità dovesse dare l'esito previsto, non includere i dati nel referto del paziente e non utilizzare il prodotto prima di aver contattato l'Assistenza tecnica.

1. Aggiungere 1 ml di VersaTREK Myco GS ai flaconi di coltura VersaTREK Myco.

2. Reidratare il prodotto VersaTREK Myco Streptomycin liofilizzato con acqua sterile e preparare la diluizione da 5 ml a 15 ml, come descritto nella sezione “Inoculazione dei flaconi di coltura VersaTREK Myco per il test di sensibilità Myco".

3. Aggiungere al flacone VersaTREK Myco 1,0 ml della concentrazione del farmaco pari a 120 µg/ml. La concentrazione finale di streptomicina presente nel flacone di coltura Myco sarà di 8 µg/ml.

4. Aggiungere 1,0 ml della concentrazione del farmaco pari a 30 µg/ml a un secondo flacone VersaTREK Myco. La concentrazione finale di streptomicina presente nel flacone di coltura Myco sarà di 2 µg/ml.

5. Aggiungere 1,0 ml di acqua distillata o deionizzata sterile al flacone del controllo di crescita.

6. Aggiungere 0,5 ml della diluizione 1:10 della coltura presente in un flacone VersaTREK Myco positivo ai flaconi di coltura appropriati, contenenti il farmaco, e al flacone del controllo di crescita senza farmaco.

7. Dopo aver riscontrato i risultati previsti, utilizzare la parte rimanente del lotto per sottoporre a test gli altri campioni. Qualora non si verificassero i risultati previsti, contattare l'Assistenza tecnica.

8.

Tabella 4: Risultati previsti per i ceppi CQ

Microrganismo	ATCC	Streptomicina
M. tuberculosis	25618	Sensibile

Le cause più comuni di insuccesso del controllo qualità riguardano una sovra-inoculazione dei set per il test della streptomicina e una contaminazione dei campioni. Se vengono riscontrati ripetutamente dei risultati di falsa resistenza, è probabile che l'antibiotico abbia perso potenza. Si consiglia perciò di effettuare il test con un nuovo stock di streptomicina.

RISULTATI PREVISTI

È stato effettuato un test iniziale su 109 ceppi clinici di *Mycobacterium tuberculosis* per verificarne la sensibilità alla streptomicina in 4 diversi siti, utilizzando il metodo MAP (Modified Agar Proportions)[4] e il VersaTREK Myco Streptomycin Test. Entrambi i sistemi hanno rilevato 95 ceppi sensibili (87,2%). Il metodo MAP ha rilevato 6 ceppi ad alta resistenza (resistenti a 10 µg/ml di streptomicina) e 14 ceppi a bassa resistenza (resistenti a una concentrazione di 2 µg/ml di streptomicina). Il test VersaTREK Streptomycin ha rilevato 5 ceppi ad alta resistenza e 11 a bassa resistenza. Il test iniziale

è stato effettuato con una sola concentrazione (8 µg/ml) di streptomicina, che si è rivelata incoerente nel rilevare ceppi a bassa resistenza alla streptomicina.

È stata aggiunta al test un'ulteriore concentrazione di 2 µg/ml, che è stata esaminata con 14 ceppi clinici di *M. tuberculosis* e 30 ceppi CDC di prova in tre siti. Quest'ultimo test ha evidenziato una buona correlazione nel rilevamento di una bassa resistenza alla streptomicina.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Tabella 5. Risultati dello studio clinico con VersaTREK/ESP Culture System II rispetto al metodo MAP (Modified Agar Proportion)

Farmaco	MAP			VersaTREK/ESP Culture System II				
					Ceppi sensibili		Ceppi resistenti	
	Concentrazione	S.	R.	Concentrazione equivalente	N. conferme	% conferme	N. conferme	% conferme
Streptomicina	2 µg/ml	95	14	2 µg/ml	95	100	11	79
	10 µg/ml	103	6	8 µg/ml	103	100	5	83

Tabella 6. Dieci ceppi clinici (30 test) e 30 ceppi CDC di prova (60 test) di *M. tuberculosis* esaminati in due o tre siti con 2 concentrazioni di streptomicina
(I dati sono rappresentati come numero totale dei punti dati esaminati)

Farmaco	MAP			VersaTREK/ESP Culture System II				
					Ceppi sensibili		Ceppi resistenti	
	Concentrazione	S.	R.	Concentrazione equivalente	N. conferme	% conferme	N. conferme	% conferme
Streptomicina	2 µg/ml	72	18	2 µg/ml	72	100	18	100
	10 µg/ml	77	13	8 µg/ml	77	100	13	100

INFORMAZIONI SUI RISCHI

Xn Dannoso
R22 Dannoso se ingerito.
R61 Può provocare danni al nascituro.
S37 Indossare guanti appropriati.
S53 Evitare l'esposizione; consultare le istruzioni speciali prima dell'uso.

RIFERIMENTI: pg. 7

Per maggiori informazioni, contattare l'Assistenza Tecnica di TREK Diagnostic Systems al numero 1-216-351-8735.

Français

VersaTREK® Myco Streptomycin, 7120-30

UTILISATION PREVUE

Le test Versa TREK myco streptomycin est un procédé qualitatif rapide pour tester la sensibilité in vitro à la Streptomycine à partir d'une culture de Mycobacterium tuberculosis. VersaTREK myco Streptomycin est utilisé avec le VersaTREK Automated Microbial detection System (VTI) et le ESP® Culture System II (ESP).

RESUME ET EXPLICATION

Le diagnostic rapide de la tuberculose est important pour le commencement des traitements médicamenteux appropriés et l'institution de mesures pour empêcher la diffusion de cette maladie fortement contagieuse. Retarder le traitement, particulièrement pour les souches de *M. tuberculosis*, multi résistante aux antibiotiques (MDR-TB), peut aboutir à l'échec du traitement et à la mortalité des patients. Pour aborder ses problèmes, des microbiologistes cliniques sont priés d'utiliser des essais de diagnostiques les plus sensibles et rapides fournissant des résultats fiables. Les experts du CDC (Centre for Desease Control) ont émis plusieurs recommandations quant aux tests Mycobactériens, y compris l'utilisation d'un milieu a la fois solide et liquide pour les cultures Mycobactérienne.

Pour la mise à l'épreuve de la sensibilité de M. tuberculosis à la streptomycine, le système VTI/ESP combine un milieu de culture liquide, (VersaTREK Myco Broth), un supplément de croissance (VersaTREK Myco GS), et des concentrations spécifiques de Streptomycine avec un système dedétection qui incube automatiquement et contrôle continuellement la culture inoculée avec des isolats de M. tuberculosis d'une variété de spécimens. Les éponges des flacons de VersaTREK Myco fournissent une matrice de support de croissance et augmente la superficie exposée à l'oxygène de « l'espace de tête ». La technologie du système VTI/ESP est basée sur la détection du changement de pression en raison de la croissance microbienne dans l'espace de tête d'un flacon scellée .Un logarithme spéciale a été développé pour la détection de croissance très lente des Mycobactéries.

Avec le système de VTI/ESP, l'antibiotique de la Streptomycine contre la tuberculose peut être injecté dans le flacon VersaTREK Myco complété avec VersaTREK Myco GS. Un inoculum d'une culture confirmée de *M. tuberculosis* provenant d'un flacon ensemencé, est ajouté à un flacon de contrôle positif, et à un flacon contenant de la streptomycine. Si l'organisme est sensible à l'antibiotique, aucune croissance ne sera détectée ou alors retardée. Si l'organisme est résistant à la streptomycine, une croissance microbienne sera détectée par la génération d'une courbe allant vers le bas à partir de la ligne de base. Le temps de détection du flacon sans antibiotique détermine quand le test est terminé. L'antibiotique utilisé dans ce système est la streptomycine qui est hydratée avec de l'eau stérile à une concentration critique spécifique. Ces concentrations spécifiques sont 2µg/ml et 8µg/ml.

La détection de la croissance microbienne par le système VTI/ESP est basée sur la mesure sensible de production de gaz et/ou la consommation de gaz dans l'espace de tête du flacon ensemencée de culture. Cette information est utilisée pour produire une courbe de pression pour chaque flacon. Un logarithme interne analyse les informations pour déterminer le statut de chaque échantillon d'essai. Quand un ensemble de conditions est rencontré, un flacon est signalé positif. Il y a environ 10^6 cellules souches/ml de Mycobactéries au moment de la détection.

PRINCIPE

Le test de la sensibilité des spécimens de *M. tuberculosis* est exécute avec le système VTI/ESP en inoculant une suspension d'organismes dans des flacons de bouillon VersaTREK Myco GS et VersaTREK Myco streptomycin. Un connecteur VersaTREK connector est attaché à chaque flacon pour établir un système fermé pour contrôler les flacons avec l'instrument VTI/ESP. Une membrane hydrophobe se trouvant dans le VersaTREK connector empêche la production d'aérosols.

Les informations sur les isolats sont entrées dans l'ordinateur du système et les flacons sont placés dans l'instrument pour incubation à 35 – 37 ˚C dans des conditions stationnaires. Le système VTI/ESP détecte la croissance de Mycobactéries en contrôlant continuellement (toutes les 24 mins) le taux de consommation d'oxygène dans l'espace de tête du flacon de culture et annonce la croissance avec un signal positif. A la fin de la période d'incubation indiquée, comme déterminé par le flacon de contrôle sans antibiotiques pour chaque isolat testé, l'isolat est manuellement déterminé pour être sensible ou résistant à l'antibiotique.

REACTIFS

VersaTREK Myco Streptomycin contient une fiole de Streptomycine lyophilisé. La fiole doit être réhydraté avec 25 ml d'eau stérile distillée ou déionisée.

FORMULE SUR LA REHYDRATATION*

(H_20)	Eau traitée	25ml
(STR)	Streptomycine	0.012%w/v
(SA)	Agent solubilisant	1.25%w/v

*Ajustée pour rencontrer les critères de performance

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. A utiliser en diagnostic *in vitro*
2. Se référer aux notices techniques matérielles de sécurité pour des informations complètes des dangers
3. AVERTISSEMENTS ! TEST DE SPECIMENS POTENTIELLEMENT DANGEREUX. Suivre les précautions universelles et les politiques institutionnelles dans le traitement et la disposition des agents infectieux.
4. Lors de travaux avec des cultures de *M. tuberculosis*, les recommandations sont de niveau 3 de biosécurité pour les pratiques, les équipements de confinement et les facilités.
5. Le VersaTREK connector contient une aiguille enfoncée stérile lors du premier enlèvement de joint mais est potentiellement contaminée à la fin de l'utilisation.
6. Inspecter visuellement tous les flacons pour contamination, fissures ou autres signes de détérioration. Ne pas utiliser de flacons apparaissant troublés ou fissurés.
7. Utiliser uniquement des seringues à butées
8. Autoclaver tous les flacons de VersaTREK Myco avant de disposer.

STOCKAGE

Stocker à 2-8˚C. Protéger contre la lumière. Lors de la réhydratation, stocker à 2-8˚C et utiliser dans les 4 semaines, ou congeler à -20˚C et utiliser dans les 3 mois. Une fois décongelé, ne pas recongeler.

DATE DE PEREMPTION

La date de péremption s'applique au produit dans son contenant intact (non ouvert) quand stocké comme adressé. Le test VersaTREK Streptomycin ne doit pas être utilisé au delà de la date de péremption indiquée.

PROCEDURE: TEST DE LA SENSIBILITE DE *M. tuberculosis* UTILISANT LE VERSATREK/ESP CULTURE SYSTEM II

Matériels fournis :

VersaTREK Myco Streptomycin	7120-30
VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Connectors	7150-44

Matériels nécessaires mais non fournis:
Autoclave
Milieu Middlebrook 7H10 ou autre milieu pour la culture de Mycobactéries ou milieu à base d'œufs, pour contrôler la pureté
Étuve à CO2, 37ºC
Anse stérile
Seringue stérile avec aiguille montée
Désinfectant mycobactérien (ex : Amphly™, OMNI™, etc)
Ecouvillon d'alcool
Agitateur Vortex
Armoire biologique de sécurité
Microscope
Matériels pour coloration de lames
Organisme de contrôle qualité: *M. tuberculosis* ATCC® 25618

Inoculation de VersaTREK Myco Culture Bottles pour tester la sensibilité Myco

1. Etiqueter chaque flacon de culture VersaTREK Myco avec les informations d'identification. Pour le test de Streptomycine, 3 flacons vont être utilisées par test

2. Désinfecter les fermetures des flacons de cultures avec de l'alcool.

3. Aseptiquement, ajouter 1.0 ml de VersaTREK myco GS dans chaque flacon en injectant à travers le septum à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille.

4. Réhydrater le VersaTREK Myco Streptomycin lyophilisé en ajoutant aseptiquement 25 ml d'eau stérile distillée ou déionisée. Ceci donne une concentration de 120µg/ml.

5. Aseptiquement, enlever 5 ml de la solution et la transférer dans un conteneur stérile. Ajouter 15 ml d'eau stérile distillée ou déionisée. Ceci donne une concentration de 30µg/ml.

6. Aseptiquement, ajouter 1.0 ml de la solution a 120µg/ml dans un flacon de culture en injectant a travers le septum à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille. La concentration finale de la Streptomycine de la culture du flacon de Myco est de 8µg/ml.

7. Aseptiquement ajouter 1.0 ml de la solution a 30µg/ml dans un deuxième flacon de culture en injectant à travers le septum à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille. La concentration finale de la Streptomycine de la culture du flacon de Myco est de 2µg/ml.

TABLEAU 1: Préparation de l'antibiotique antituberculeux.

Antibiotique et concentration finale dans le flacon de VersaTREK Myco	**Volume de diluant ajouté a la streptomycine lyophilisée**	**Concentration après réhydratation**	**Additionnelles Dilutions**	**Concentration à être injectée dans le flacon test**	**Nombre de test par fiole**
Streptomycine 8.0 µg/ml	25 ml	120 µg/ml	Non	120 µg/ml	20
Streptomycine 2.0 µg/ml		⇓⇒	5 ml de l'antibiotique dilué plus 15 ml d'eau	30 µg/ml	20

8. Pour le flacon sans antibiotique de contrôle, ajouter 1.0 ml d'eau stérile à la place de l'antibiotique. 20 tests peuvent être exécutés à partir d'une seule fiole.

9. L'inoculum du spécimen pour le test de sensibilité doit être confirmé comme une culture pure de *M. tuberculosis* avant d'effectuer le test de la streptomycine et doit être préparé comme suit:

   a) **Suspension cellulaire équivalant à McFarland** – Des isolats purs (pas âgé de plus de 4-5 semaines) poussant sur une gélose agar appropriée pour les mycobactéries (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11, Lowenstein-Jensen inclinés) sont prélevés à l'aide d'une anse stérile et placés dans un tube contenant 9 à 10 ml d'eau stérile distillée ou déionisée et des billes de verre. Le tube est vortexé et laissé au repos pendant 15 minutes. Approximativement 5 ml de la couche supérieure est enlevée, placée dans un tube stérile et ajusté à McFarland 1 (approximativement 3.0×10^7 cellules souches/ml) utilisant de l'eau stérile distillée ou déionisée.

   b) **Flacon VersaTREK Myco ensemencé** – Préparer une suspension McFarland 1 à partir d'un isolat test d'un milieu agar ou liquide (croissance dans le milieu Middlebrook 7H9). Aseptiquement injecter 0.5 ml de cette dilution dans un flacon de culture VersaTREK Myco supplémenté avec 0.1 ml de VersaTREK Myco GS. Un VersaTREK connector stérile est placé sur le flacon qui est incubée dans l'appareil jusqu' à ce qu'un signal positif soit observé (environ 10^6 cellules souches/ml) Une fois le signal positif atteint, le VersaTREK connector est enlevé et le flacon est vortexé pendant 1-2 minutes. L'inoculum du flacon ensemencé doit être utilisé dans les 72 heures après le signal positif de l'appareil.

10. Faire une dilution au 1/10ieme de la suspension McFarland 1 à partir du milieu agar ou du flacon ensemencé dans une solution saline stérile ou d'eau distillée (inoculum pour le test). Ajouter 0.5 ml à chaque bouillon de contrôle et de test.

11. Essuyer les flacons de cultures et leurs fermetures avec un désinfectant Mycobactéricide.

12. Mixer tous les flacons en les retournant plusieurs fois.

13. Enlever le joint du fond de VersaTREK Connector. Appuyer sur le bout de l'aiguille de VersaTREK connector a travers de la fermeture du flacon de culture. NOTE: ne pas retourner le flacon de culture quand le connecteur est attaché sur le flacon. Le fluide se trouvant dans l'aiguille pourrait interférer avec la lecture de la pression des flacons.

14. Placer le flacon de culture avec le VersaTREK connector dans l'appareil. Se référer au manuel d'utilisation du système VersaTREK/ESP pour les détails des flacons à entrer.

    Suggestion de chargement: si le numéro d'accès de l'échantillon est « 123 », donner comme numéro d'accès du flacon test à la streptomycine ,123PC pour le contrôle positif, et 123S2 et 123S8 pour les test de bouillon à la streptomycine. Dans ce cas, tous les flacons associés à ce nombre d'accès sera capable d'être rechercher et situé comme une groupe.

15. Une méthode alternative pour ajouter des réactifs et inoculer les flacons de bouillon est d'enlever le bouchon et la fermeture, et faire les ajouts à l'aide d'une pipette stérile. Une fermeture attentionnée de la fermeture et du bouchon est exigée.

RESULTATS

Pour les tests de sensibilité utilisant le VersaTREK/ESP Culture System II, un isolat est interprété comme étant sensible ou résistant à un antibiotique suivant (arrondir tous les temps de détection au jour entier le plus proche):

1. Dès que le flacon sans antibiotique est devenu positif, enregistrer le temps de détection (ceci se trouve sur le graphique du flacon test).

2. Trois jours en plus, arrondi au nombre entier le plus proche, d'incubation après que le flacon sans antibiotique soit signalé positif, chercher et enregistrer les résultats des autres flacons test pour l'isolat.

3. **Sensible**: un isolat d'un flacon contenant un antibiotique qui n'aurait pas émis de signal dans les 3 jours du temps de détection du contrôle sans antibiotique, est déterminé être sensible à la concentration de cet antibiotique. La croissance après 3 jours, arrondi au nombre entier le plus proche, du flacon de contrôle signalée positif devra être jeté parce que ce n'est pas considéré comme étant une indication de résistance. Pour arrondir au nombre entier le plus proche, si temps ≤ XX,49 il faut arrondir au chiffre inférieur et si temps ≥ XX,50 il faut arrondir au chiffre supérieur.

4. **Résistant**: Le temps de détection des bouteilles de médicament est de ± trois jours (arrondi au nombre entier le plus proche) le temps de détection de la bouteille témoin sans médicament (arrondi au nombre entier le plus proche). Pour arrondir au nombre entier le plus proche, si temps ≤ XX,49 il faut arrondir au chiffre inférieur et si temps ≥ XX,50 il faut arrondir au chiffre supérieur.

   NOTE :
   - Aucune boueille ne doit pas être repérée positive avant le troisième jour. Les bouteilles qui sont repérées avant le troisième jour sont soit contaminées, soit l'inoculum est trop élevé. L'analyse doit être répétée.
   - Une bouteille de test peut être repérée avant la bouteille témoin (voirTableau 3 exemple D).

   Tous résultats de résistance devront être confirmés par une méthode alternative avant d'être reporté.

Les flacons signales positifs devront être colorés pour AFB (Acid Fast Bacilli) et repiqué sur un milieu gélosé de Middlebrook 7H10 ou 7H11, et sur un milieu gélose non sélectif (comme une gélose au sang) pour être sur de la pureté du spécimen. Les flacons de contrôle de croissance qui ont signalé en moins de 2 jours et demi pourraient indiquer la présence d'un contaminant non mycobactérien tandis que les flacons de contrôle qui n'ont pas émis de signal dans les 10 jours après avoir été inoculé pourraient être signe d'une mauvaise préparation du flacon. Dans ces deux cas, le spécimen devra être reteste.

Toujours vérifier le graphique des isolats avant de reporter les résultats. Se référer au manuel d'utilisation pour l'analyse des graphes. Si les graphes pour les tests qui ont émis un signal positif ne paraissent pas normaux, contacter le service du support technique de Trek au 1-216-351-8735.

TABLEAU 2: Test d'observation et Test d'évaluation

Falcon Test	Résultat obtenu	Possible cause	Action
Contrôle de croissance	<3 jours à partir de l'inoculation	Contamination possible ou inoculum trop lourd; vérifier la pureté des plaques et les graphes	REPETER TEST
Contrôle de croissance*	>10 jours à partir de l'inoculation	Pas d'organismes viables, inoculum trop léger	REPETER TEST
Contrôle de croissance	Croissance détectée entre 3 et 10 jours après inoculation		Essai valable- évaluer l'antibiotique du flacon
Vérification de pureté	Pas de contamination observée à au moins 18 heures d'une gélose au sang		Test valable
	Pas d'organismes AFB observés	La Culture n'était pas pure	REPETER TEST
	Pas de colonie variée observée sur gélose de Middlebrook		Essai valable - pas d'action
	Colonies variés observés sur gélose de Middlebrook	Plus d'une espèce de Mycobactérie sont présentes	REPETER TEST pour vérifier les résultats; prévenir le physicien que les résultants finaux sont en suspens

*La gamme supérieure de 10 jours de temps de détection pour le contrôle de croissance a été établie par des données cliniques et internes.

Soyer sûr de contrôler que les résultats des sous cultures du milieu gélose pour Mycobactéries pour vérifier que seulement une espèce de Mycobactéries soit présentes, précisément dans le cas de résultats résistant.

TABLEAU 3: Exemples de résultats pour le calcul de la susceptibilité de souches de *M. tuberculosis* à VersaTREK Myco Streptomycin

Patient	A	B	C	D	E	F	G
Streptomycine Témoin Positif (Jours)	2	4	5	9	10	10	12
Streptomycine Médicament Positif (Jours)	5	2	6	7	14	13	10
Résultat	Contrôle de la croissance invalide, Analyse répétée	Invalide, Analyse répétée	Résistant*	Résistant*	Susceptible	Résistant*	Contrôle de la croissance invalide, Analyse répétée

*Tous les résultats Résistant doivent être confirmés par une autre méthode avant d'être annoncés.

LIMITES D'UTILISATION

1. Le test de sensibilité VersaTREK Myco Streptomycin n'interprète pas le degré de sensibilité d'un isolat testé. C'est un test uniquement qualitatif.

2. Le test de sensibilité VersaTREK Myco peut être seulement effectué dans les appareils VTI ou ESP. Les tests ne peuvent pas s'effectuer manuellement.

3. Utiliser seulement des cultures pures de *M. tuberculosis*. L'utilisateur doit confirmer la pureté de la culture, particulièrement si le résultat est résistant. Les cultures contenant multiples espèces de Mycobactéries peuvent donner des résultats erronés.

4. L'échec de la préparation des isolats en suivant les recommandations du fabricant peut mener à des résultats imprécis.

5. L’échec de la réhydratation de la streptomycine avec le bon volume d’eau stérile peut donner des résultats imprécis.

6. Bien mixer les flacons inoculés est important. L’échec de l’adéquat mixage peut mener à de faux résultats de résistance.

7. L’échec de l’utilisation du bouillon de supplément VersaTREK Myco GS peut mener à de faux résultats de sensibilité.

CONTROLE QUALITE

Un nouveau lot ou une expédition de VersaTREK Myco Streptomycin devra être testé avec des organismes de contrôle qualité *M. tuberculosis* ATCC 25618 (sensible à la streptomycine). Les résultats attendus sont montrés dans le tableau 4. Le contrôle qualité devra être effectué une fois chaque semaine lors de la performance du test de sensibilité. L’observation de résultats réels, dans les 4-13 jours, indique que les réactifs sont prêts à être utilisé pour tester des isolats de patients.

Si les résultants réels ne sont pas observés, ne pas reporter les résultats des patients. Répéter le contrôle qualité et tout autres isolats de patients affectés par l’erreur initiale du contrôle qualité. Si le contrôle qualité répété ne donne toujours pas les résultats attendus, ne pas reporter les résultats des patients. Ne pas utiliser le produit avant d ‘avoir contacté les services techniques.

1. Ajouter 1 ml de versaTREK Myco GS au flacon de culture VersaTREK Myco.

2. Réhydrater VersaTREK Myco Streptomycin lyophilisé avec de l’eau stérile, et préparer une dilution de 5 ml dans 15 ml, comme décris sous "Inoculation de VersaTREK Myco Culture Bottles pour tester la sensibilité Myco".

3. Ajouter 1.0 ml de l’antibiotique ayant une concentration de 120 µg/ml à un flacon de VersaTREK Myco. La concentration finale de la streptomycine du flacon contenant la culture de Myco est de 4 µg/ml.

4. Ajouter 1.0 ml de l’antibiotiques ayant une concentration de 30 µg/ml à un deuxième flacon VersaTREK Myco. La concentration finale de la streptomycine du flacon de Myco est de2 µg/ml.

5. Ajouter 1.0 ml d’eau stérile distillée ou déionisée dans le flacon de croissance de contrôle.

6. Ajouter 0.5 ml de la dilution au 1/10ieme de la culture provenant d’un flacon ensemence positif VersaTREK à un flacon de culture appropriées contenant l’antibiotique et au flacon de croissance de contrôle ne contenant pas d’antibiotique.

7. Apres l’observation des résultants attendus, utiliser le reste des spécimens testé du lot. Si les résultats attendus ne sont pas atteints, contacter l’assistance technique.

Table 4: Résultats attendus des souches QC

Organisme	ATCC	Streptomycine
M. tuberculosis	25618	Sensible

Les causes les plus communes des erreurs du contrôle qualité sont la surcharge de l’ensemencement des kits des tests de la streptomycine et la contamination. Si les faux résultats de résistance répétés sont obtenus, l’antibiotique de la streptomycine a surement perdu son activite. La recommandation sera de retester avec un nouveau stock de l’antibiotique.

RESULTATS ATTENDUS

Le test initial de 109 souches cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* a été effectuée pour la sensibilité de la streptomycine a 4 différents sites utilisant la méthode de la gélose à proportion modifiée (MAP) et le test VersaTREK Myco Streptomycin . Chacun des systèmes a détecté 95 souches sensibles (87.2%). La méthode de MAP a détecté 6 souches hautement résistantes (résistance de la streptomycine à la concentration de 10 µg/ml), et 14 souches faiblement résistantes (résistance de la streptomycine a la concentration de 2 µg/ml). Le test de VersaTREK Myco Streptomycin a détecté 5 souches hautement résistantes, et 11 faiblement résistantes. Le test initial a été effectué avec seulement une seule concentration (8 µg/ml) de streptomycine, qui se trouve être inconsistant dans la détection des souches faiblement résistantes à la streptomycine. Une autre concentration 2 µg/ml a été ajouté au test avec 14 souches cliniques de *M. tuberculosis*, et 30 CDC souches challenge à 3 sites. Ce test a montré de bonne corrélation dans la détection de faible résistance a la streptomycine.

CHARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Tableau 5. Resultats de l' étude Clinique avec le VersaTREK/ESP Culture System II
Comparaison à la méthode de la gélose a proportion modifiée (MAP)

antibiotique	MAP			VersaTREK/ESP Culture System II				
					Souches Sensibles		Souches résistantes	
	Concentration	#S	#R	Concentration Equivalente	# Accord	% Accord	# Accord	% Accord
Streptomycine	2 µg/ml	95	14	2 µg/ml	95	100	11	79
	10 µg/ml	103	6	8 µg/ml	103	100	5	83

Tableau 6. Dix souches cliniques (30 tests) et 30 CDC souches challenges (60 tests)
de *M. tuberculosis* teste a deux ou trois sites avec 2 concentrations de Streptomycine
(Les données sont représentées comme nombre total de points de données testées)

Antibiotique	MAP			VersaTREK/ESP Culture System II				
					Souches Sensibles		Souches resistantes	
	Concentration	#S	#R	Concentration Equivalente	# Accord	% Accord	# Accord	% Accord
Streptomycine	2 µg/ml	72	18	2 µg/ml	72	100	18	100
	10 µg/ml	77	13	8 µg/ml	77	100	13	100

INFORMATION DE DANGER
Xn Nuisible
R22 Nuisible si avalé.
R61 Peut causer nuisance à l'embryon.
S37 Porter des gants de protections appropriés.
S53 Eviter l'exposition - Obtenir des instructions spéciales avant l'utilisation.

RÉFÉRENCES: Page 7

Pour informations supplémentaires, appeler l'assistance technique de TREK au 1-216-351-8735.

Português

VersaTREK® Myco Streptomycin, 7120-30

UTILIZAÇÃO PREVISTA
O teste VersaTREK Myco Streptomycin é um teste rápido qualitativo da sensibilidade *in vitro* à Estreptomicina para cultura de *Mycobacterium tuberculosis*, à . O VersaTREK Myco Streptomycin é utilizado com o VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) e o ESP® Culture System II (ESP).

RESUMO E EXPLICAÇÃO
O diagnóstico rápido da tuberculose é importante para a dar início a uma terapia medicamentosa apropriada e para o estabelecimento de medidas de prevenção da disseminação desta doença altamente contagiosa. O tratamento retardado, em particular da estirpe resistente a múltiplos antibióticos do *M. tuberculosis* (MDR-TB), pode resultar numa falha do tratamento e na morte do doente.[1] De forma a obviar estas questões, os microbiologistas clínicos deverão utilizar os testes de diagnóstico mais rápidos e sensíveis que forneçam resultados fiáveis. Os peritos dos Centros de Controlo de Doença (CDC) efectuaram várias recomendações no que toca ao teste micobacteriano, incluindo a utilização de meios líquidos e sólidos para cultura micobacteriana. [2]

Para o teste de sensibilidade à estreptomicina do *M. tuberculosis*, o sistema VTI/ESP combina um meio de cultura líquido (caldo VersaTREK Myco), um suplemento de crescimento (VersaTREK Myco GS) e concentrações específicas de estreptomicina com um sistema de detecção que automaticamente incuba e continuamente monitoriza a cultura inoculada com isolados de *M. tuberculosis* de amostra de diferentes origens. Os tampões nas garrafas VersaTREK Myco fornecem uma matriz de suporte de crescimento e aumento da área de superfície exposta ao oxigénio do espaço livre. A tecnologia do Sistema VTI/ESP é baseada na detecção das alterações de pressão do espaço livre numa garrafa selada, devido a crescimento microbiológico. Foi desenvolvido um algoritmo especial para detecção de micobactérias de crescimento lento.

Com o Sistema VTI/ESP, o antibiótico anti-tuberculose estreptomicina pode ser injectado nas garrafas VersaTREK Myco suplementadas com VersaTREK Myco GS. Um inóculo de uma cultura confirmada de *M. tuberculosis* provenienteo de uma garrafa para processamento é adicionado a uma garrafa de controlo isento de antibióticos, utilizada como controlo positivo e a uma garrafa de teste que contenha estreptomicina. Se o microrganismo for sensível ao antibiótico, não será detectado crescimento microbiológico ou será detectado crescimento retardado. Se o microrganismo for resistente à estreptomicina, o crescimento microbiológico será detectado pelo aparecimento de uma curva que irá apresentar uma curva descendente relativamente à linha de base. O tempo de detecção da garrafa isenta de antibiótico determina quando um teste está concluído. O antibiótico utilizado neste sistema é a estreptomicina, que é hidratada com água esterilizada a uma concentração crítica específica. As concentrações de antibiótico específicas para este antibiótico são 2 µg/ml e 8 µg/ml.

A detecção de crescimento microbiológico no Sistema VTI/ESP baseia-se na medição sensível da produção de gás e/ou consumo de gás dentro do espaço livre de uma garrafa de cultura processada. Esta informação é utilizada para criar uma curva de pressão para cada garrafa. Um algoritmo interno analisa a informação, de forma a determinar o estado de cada amostra de teste. Quando é definido um conjunto de condições, uma garrafa é assinalada positiva. Existem aproximadamente 10^6 CFU/ml de micobactérias na altura da detecção.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO
O teste de sensibilidade de amostras de *M. tuberculosis* é efectuado com o Sistema VTI/ESP, através da inoculação de uma suspensão de microrganismos nas garrafas de caldo VersaTREK Myco, suplementados com VersaTREK Myco GS e VersaTREK Myco Streptomycin. Um VersaTREK Connector é fixado a cada garrafa, de forma a estabelecer um sistema fechado para monitorização da garrafa com o aparelho VTI/ESP. Uma membrana hidrofóbica no VersaTREK Connector evita a produção de aerossóis.

A informação de isolados é introduzida no computador do sistema e as garrafas são colocadas no aparelho para incubação a 35 – 37 °C, em condições estáveis. O Sistema VTI/ESP detecta o crescimento Micobacteriano, monitorizando continuamente (a cada 24 minutos) a taxa de consumo de oxigénio no espaço livre da garrafa de cultura e reportando essa resposta de crescimento com um sinal positivo. No final do período de incubação especificado, tal como determinado pela garrafa de controlo isenta de antibióticos de cada isolado testado, o isolado é manualmente determinado como sensível ou resistente ao antibiótico.

REAGENTES
O VersaTREK Myco Streptomycin contém uma garrafa de estreptomicina liofilizada. A garrafa deve ser re-hidratada com 25 ml de água esterilizada destilada ou desionizada.

FÓRMULA NA RE-HIDRATAÇÃO*

(H2O)	Água Destilada	25 ml
(STR)	Estreptomicina	0,012% peso/volume
(SA)	Agente de Solubilização	1,25% peso/volume

*Ajustada para corresponder aos critérios de controlo de qualidade

PRECAUÇÕES
1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
2. Consulte as Fichas de Segurança do Material para uma informação completa sobre os riscos.
3. AVISO! AMOSTRA DE TESTE POTENCIALMENTE INFECCIOSA. Siga as Precauções Universais e a política institucional de manipulação e eliminação de agentes infecciosos.
4. No trabalho com culturas de *M. tuberculosis*, recomendam-se as práticas, equipamento de contenção e instalações de Nível 3 de Biosegurança[3]
5. O VersaTREK Connector contém, uma agulha afiada encastrada e esterilizada aquando da remoção do selo, mas potencialmente contaminada no final da sua utilização.
6. Inspeccione visualmente todas as garrafas no que respeita a contaminação, fissuras ou outros sinais de deterioração. Não utilize garrafas que se apresentem turvas ou com fissuras.
7. Utilize apenas seringas com bloqueio de agulha.
8. Proceda à autoclavagem de todas as garrafas VersaTREK Myco antes da eliminação.

ARMAZENAMENTO
Conservar entre 2°C e 8°C. Proteger da exposição solar. Na re-hidratação, conservar entre 2º e 8°C e utilizar dentro de 4 semanas ou congelar a -20°C e utilizar dentro de 3 meses. Depois de descongelado, não voltar a congelar.

PRAZO DE VALIDADE
O prazo de validade aplica-se ao produto na sua embalagem intacta (por abrir) quando armazenado conforme instruções. O teste VersaTREK Streptomycin não deve ser utilizado para além do prazo de validade indicado.

PROCEDIMENTO: TESTE DE SENSIBILIDADE DE *M. tuberculosis* UTILIZANDO O VERSATREK/ESP CULTURE SYSTEM II

Materiais Fornecidos:

VersaTREK Myco Streptomycin	7120-30
Garrafas de Cultura VersaTREK Myco	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Connectors	7150-44

Materiais Necessários mas Não Fornecidos:
Água esterilizada destilada ou desionizada
Autoclave
Middlebrook 7H10 ou outro meio micobacteriano com base de agar e ovo, para verificações da pureza
Incubador deCO_2, 37ºC
Placas de Petri esterilizadas
Seringas de tuberculina esterilizadas com agulhas fixas permanentes
Desinfectante Micobacteriano (p. ex., Amphly™, OMNI™, etc.)
Tampões de álcool
Misturador vórtex
Câmara de fluxo laminar
Microscópio
Materiais para lâminas de coloração
Microrganismo de Controlo de Qualidade; *M. tuberculosis* ATCC® 25618

Inoculação de Garrafas de Cultura VersaTREK Myco para Teste de Sensibilidade Myco

1. Identifique com uma etiqueta cada garrafa de cultura VersaTREK Myco com a informação de identificação. Para o teste de estreptomicina, serão utilizadas 3 garrafas por teste.

2. Desinfecte as tampas das garrafas de cultura com álcool.

3. Adicione de forma asséptica **1,0 ml** de VersaTREK Myco GS a cada garrafa de cultura, injectando através do septo com uma agulha e seringa.

4. Re-hidrate VersaTREK Myco Streptomycin liofilizado, adicionando assepticamente 25 ml de água esterilizada destilada ou desionizada. O que resultará numa concentração de antibiótico de 120 µg/ml.

5. Remova assepticamente 5 ml da solução e transfira para um recipiente esterilizado. Adicione 15 ml de água esterilizada destilada ou desionizada. O que resultará numa concentração de antibiótico de 30 µg/ml.

6. Adicione de forma asséptica **1,0 ml** da concentração de antibiótico de 120 µg/ml a uma garrafa de cultura, injectando através do septo com uma agulha e seringa. A concentração de estreptomicina final na garrafa de cultura Myco é de 8 µg/ml.

7. Adicione de forma asséptica **1,0** ml da concentração de antibiótico de 30 µg/ml a uma segunda garrafa de cultura, injectando através do septo com uma agulha e seringa. A concentração de estreptomicina final na garrafa de cultura Myco é de 2 µg/ml.

TABELA 1: Preparação de Medicamento Anti-Tuberculose

Concentração do Antibiótico e Final nas Garrafas VersaTREK Myco	**Quantidade de Diluente Adicionado a Estreptomicina Liofilizada**	**Concentração Após Re-hidratação**	**Diluições Adicionais**	**Concentração a Injectar nas Garrafas de Teste**	**Número de Testes por Garrafa**
Estreptomicina 8,0 µg/ml	25 ml	120 µg/ml	Não	120 µg/ml	20
Estreptomicina 2,0 µg/ml		⇓⇒	5 ml de antibiótico diluído mais	30 µg/ml	20

8. Para o controlo isento de antibiótico, adicione **1,0 ml** de água esterilizada em vez de antibiótico. Podem ser efectuados vinte testes de uma só garrafa.

9. O inóculo de uma amostra para teste de sensibilidade deve ser confirmada como cultura pura de *M. tuberculosis*, antes do teste de estreptomicina e preparado como segue:

   a) **Suspensão equivalente a McFarland** - Os isolados puros (que não excedam 4 a 5 semanas) cultivados num meio sólido micobacteriano apropriado (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11, geloses inclinadas Lowenstein-Jensen) são retirados(?) utilizando uma ansa esterilizada e colocados num tubo contendo aproximadamente 9 a 10 ml de água esterilizada destilada ou desionizada e esferas de vidro. O tubo é agitado num misturador vórtex e deixado a repousar durante 15 minutos. São removidos aproximadamente 5 ml da camada superior, colocados num tubo de ensaio esterilizado e ajustados ao equivalente de 1 na escala McFarland (aproximadamente 3,0 x 10^7 CFU/ml) utilizando água esterilizada destilada ou desionizada.

   b) **Garrafa para Processamento VersaTREK Myco** - Prepare o equivalente a 1 McFarland a partir de um meio líquido ou sólido (cultivado em Middlebrook 7H9) do isolado de teste. Injecte de forma asséptica 0,5 ml desta diluição numa garrafa de cultura VersaTREK Myco fornecido, com 1,0 ml de VersaTREK Myco GS. Um VersaTREK Connector esterilizado é colocado na garrafa e a garrafa é incubada no aparelho até ser observado um sinal positivo (aprox. 10^6 CFU/ml). Depois de atingido um sinal positivo, o VersaTREK Connector é removido e a garrafa agitada durante 1 a 2 minutos. O inóculo da garrafa de processamento deve ser utilizado dentro de 72 horas do sinal de aparelho positivo.

10. Efectue uma diluição 1:10 d suspensão McFarland. 1 de meio sólido ou da garrafa para processamento Myco em água esterilizada salina ou destilada (inóculo para teste). Adicione 0,5 ml a cada caldo de controlo e de teste.

11. Limpe as garrafas de cultura e as tampas com um desinfectante Micobactericida.

12. Homogeneíze todas as garrafas invertendo várias vezes.

13. Remova o selo do fundo de um VersaTREK Connector. Prima a extremidade da agulha do VersaTREK Connector através da tampa da garrafa de cultura. NOTA: Não inverta a garrafa de cultura enquanto o conector está na garrafa. O fluido na agulha pode interferir com as leituras de pressão d garrafa.

14. Coloque a garrafa de cultura com o VersaTREK Connector no aparelho. Consulte o Manual do Utilizador do Sistema VersaTREK/ESP para detalhes sobre a introdução de garrafas.

    Sugestão de carregamento: Se o número de acesso da amostra for "123", atribua números de acesso a garrafas de teste de estreptomicina, como 123PC para controlo positivo e 123S2 e 123S8, para caldos de teste de estreptomicina. Desta forma, todas as garrafas associadas a este número de acesso de amostra poderão ser pesquisados e localizados como um grupo.

15. Um método alternativo de adicionar reagentes e inóculos às garrafas de caldo é remover a tampa e a cápsula e efectuar as adições utilizando uma pipeta esterilizada. O fecho cuidadoso da tampa e cápsula é necessário.

RESULTADOS
Para o teste de sensibilidade utilizando o VersaTREK/ESP Culture System II, um isolado é interpretado como sensível ou resistente a um antibiótico com base no seguinte (arredondar todos os tempos de detecção para o dia inteiro mais próximo):

1. Depois de a garrafa isenta de antibióticos ser positiva, registe o tempo de detecção (indicado no gráfico da garrafa de teste).

2. Pesquise e registe os resultados das outras garrafas de teste para o isolado, três dias adicionais, arredondados para o número inteiro mais próximo, de incubação depois do controlo de isenção de antibióticos dar sinal positivo.

3. **Sensível**: Um isolado numa garrafa que contenha antibiótico que não dê sinal, dentro do período de detecção de três dias de controlo de isenção de antibióticos, é determinado sensível à concentração de antibióticos. O crescimento três dias, arredondados para o número inteiro mais próximo, após a garrafa de controlo de crescimento ter dado positiva não deve ser tido em conta como indicação de resistência. Arredondar ao número inteiro mais aproximado, se tempo ≤XX.49 é arredondamento por defeito e se tempo ≥XX.50 é arredondamento por excesso.

4. **Resistente**: O tempo de detecção de garrafa de medicamento é igual a ± três dias (arredondado para o número inteiro mais aproximado) do tempo de detecção de garrafa de controlo isento de medicamentos (arredondado para o número inteiro mais aproximado). Arredondar ao número inteiro mais aproximado, se tempo ≤XX.49 é arredondamento por defeito e se tempo ≥XX.50 é arredondamento por excesso.

   NOTA:
   - Nenhum garrafa deve ser assinalado positivamente antes do terceiro dia As garrafas assinalados antes de decorridos três dias estarão contaminados ou o inoculo é demasiado elevado. O ensaio deve ser repetido.
   - Uma garraf a de ensaio pode dar sinal antes de garrafa de controlo (consultar a tabela 3, exemplo D).

   Todos os resultados resistentes devem ser confirmados por um método alternativo antes do relatório.

As garrafas que assinalem positivo devem ser coradas com corante bacilos ácido álcool resistente (AFB) e subcultivadas numa placa de gelose Middlebrook 7H10 ou 7H11, bem como numa placa de gelose não selectiva (p. ex. Agar Sangue) certificando-se da pureza da amostra. As garrafas de controlo de crescimento que dêem positivo em menos de 2,5 dias podem indicar a presença de contaminante não micobacteriano, enquanto que as garrafas de controlo que não dêem positivo dentro de 10 dias após terem sido inoculadas podem ser indicativas de preparação da garrafa indevida. Em qualquer situação, a amostra deve ser novamente testada.

Reveja **SEMPRE** o gráfico do isolado antes do relatório. Consulte o Manual do Utilizador para análise de gráficos. Se os gráficos para testes que tiverem dado sinal positivo não parecem normais, contacte o Apoio Técnico da TREK através do 1-216-351-8735.

TABELA 2: Observações de Teste e Avaliação de Teste

Garrafa de Teste	Resultado obtido	Causa possível	Acção
Controlo de crescimento	<3 dias da inoculação	Contaminante possível ou inóculo demasiado denso; verificar placas e gráficos de pureza.	REPETIR TESTE
Controlo de crescimento*	>10 dias da inoculação	Microrganismo não viável, inóculo demasiado leve	REPETIR TESTE
Controlo de crescimento	Crescimento detectado entre 3 e 10 dias após inoculação		Teste válido - avaliar garrafas de antibiótico
Verificação de pureza	Não se observou contaminantes durante pelo menos 18 horas na placa Agar Sangue		Teste válido
	Organismos não AFB observados	Cultura não era pura	REPETIR TESTE
	Variação de colónia não observada em placas agar Middlebrook		Teste válido - Sem acção
	Variação de colónia observada em placas agar Middlebrook	Mais de uma espécie de micobactéria está presente	REPETIR TESTE para verificar resultados; notificar médico que os resultados finais estão pendentes

*O limite superior de 10 dias de tempo de detecção para o controlo de crescimento foi estabelecido por dados internos e clínicos.

Assegure-se de que verifica os resultados da subcultura no meio sólido para agar micobacterias, para se certificar que apenas uma espécie de micobactéria esteve presente, especialmente no caso de um resultado resistente.

TABELA 3: Exemplos de Resultados para Cálculo de Susceptibilidade de estirpes de *M. tuberculosis* a VersaTREK Myco Streptomycin

Paciente	A	B	C	D	E	F	G
Controlo estreptomicina positivo (dias)	2	4	5	9	10	10	12
Medicamento estreptomicina positivo (dias)	5	2	6	7	14	13	10
Resultado	Controlo do crescimento inválido, repetir ensaio	Inválido, repetir ensaio	Resistente	Resistente	Susceptível	Resistente	Controlo do crescimento inválido, repetir ensaio

*Todos os resultados resistentes devem ser confirmados por um método alternativo antes do relatório.

LIMITAÇÕES

1. O teste de sensibilidade VersaTREK Myco Streptomycin não interpreta o grau de sensibilidade do isolado a testar. É um teste qualitativo.

2. O teste de sensibilidade VersaTREK Myco Streptomycin apenas pode ser efectuado em aparelhos VTI ou ESP. O teste não pode ser efectuado manualmente.

3. Utilize apenas culturas puras de *M. tuberculosis*. O utilizador deve confirmar a pureza da cultura, especialmente se o resultado for resistente. As culturas que contiverem múltiplas espécies de Micobactérias podem fornecer resultados errados.

4. A não preparação dos isolados, de acordo com as recomendações do fabricante pode levar a resultados imprecisos.

5. A não re-hidratação de estreptomicina com o devido volume de água esterilizada pode fornecer resultados imprecisos.

6. A mistura homogénea de garrafas inoculadas é importante. A falta de homogeneização adequada pode levar a falsas resistências.

7. A não utilização do suplemento de crescimento VersaTREK Myco GS pode levar a falsas sensibilidades.

CONTROLO DE QUALIDADE

Um novo número de lote ou carregamento de VersaTREK Myco Streptomycin deve ser testado com o microrganismo de controlo de qualidade de *M. tuberculosis* ATCC 25618 (sensível à estreptomicina). Os resultados esperados são apresentados na Tabela 4. O controlo de qualidade deve ser efectuado semanalmente quando o teste de sensibilidade for efectuado. A observação dos resultados esperados, dentro de 4 a 13 dias, indica que os reagentes estão prontos para utilização no teste de isolados do doente.

Se não forem observados os resultados esperados, não dê o relatório dos resultados do doente. Repita o controlo de qualidade e quaisquer isolados do doente afectados pela falha de controlo de qualidade inicial. Se a repetição de controlo de qualidade não correr conforme esperado, não dê o relatório dos resultados do doente. Não utilize o produto até ter contactado os Serviços Técnicos.

1. Adicione 1 ml de VersaTREK Myco GS às garrafas de cultura VersaTREK Myco.

2. Re-hidrate o VersaTREK Myco Streptomycin liofilizado com água esterilizada e prepare uma diluição de 5 ml a 15 ml, conforme descrito em “Inoculação de Garrafas de Cultura VersaTREK Myco para Teste de Sensibilidade".

3. Adicione 1,0 ml de concentração de antibiótico de 120 µg/ml a uma garrafa VersaTREK Myco. A concentração de estreptomicina final na garrafa de cultura Myco é de 8 µg/ml.

4. Adicione 1,0 ml de concentração de antibióticos de 30 µg/ml a uma segunda garrafa VersaTREK Myco. A concentração de estreptomicina final na garrafa de cultura Myco é de 2 µg/ml.

5. Adicione 1,0 ml de água esterilizada destilada ou desionizada à garrafa de controlo de crescimento.

6. Adicione 0,5 ml da diluição de 1:10 de cultura de uma garrafa para processamento VersaTREK Myco positivo às garrafas de cultura apropriadas que contenham o antibiótico e à garrafa de controlo de crescimento isento de antibióticos.

7. Após observação dos resultados esperados, utilize o restante lote no teste de amostras. Se não forem alcançados os resultados esperados, contacte o Apoio Técnico.

Tabela 4: Resultados Esperados Estirpe de CQ

Microrganismo	**ATCC**	**Estreptomicina**
M. tuberculosis	25618	Sensível

As causas mais comuns de falha de controlo de qualidade são o excesso de inóculo dos conjuntos de teste de estreptomicina e a contaminação. Se forem obtidos resultados repetidos de falsa resistência, o antibiótico estreptomicina deverá ter perdido a sua actividade. Recomenda-se o teste com um novo stock de antibióticos.

RESULTADOS ESPERADOS

O teste inicial de 109 estirpes clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* foi efectuado para sensibilidade à estreptomicina em 4 localizações diversas, utilizando o Método Proporções Agar Modificado (MAP)[4] e Teste VersaTREK Myco Streptomycin. Ambos os sistemas detectaram 95 (87,2%) de estirpes sensíveis. O método MAP detectou 6 estirpes de resistência alta (resistentes a 10 µg/ml de estreptomicina) e 14 estirpes de resistência baixa (resistentes a concentração de 2 µg/ml de estreptomicina). O teste VersaTREK Streptomycin detectou 5 estirpes de resistência elevada e 11 de resistência baixa. O teste inicial foi efectuado com apenas uma concentração (8 µg/ml) de estreptomicina, considerada inconsistente na detecção de estirpes de resistência baixa à estreptomicina.

Uma concentração adicional de 2 µg/ml foi adicionada ao teste e testada com 14 estirpes clínicas de *M. tuberculosis* e 30 estirpes padronizadas CDC em três localizações. Este teste mostrou uma boa correlação na detecção de resistência baixa à estreptomicina.

CARACTERÍSTICAS DE COMPORTAMENTO FUNCIONAL

Tabela 5. Resultados do Estudo Clínico com o VersaTREK/ESP Culture System II
Em comparação com o Método Proporções Agar Modificado(MAP)

Antibiótico	MAP			VersaTREK/ESP Culture System II				
					Estirpes Sensíveis		Estirpes Resistentes	
	Concentração	N.º S	N.º R	Concentração Equivalente	N.º Acordo	% Acordo	N.º Acordo	% Acordo
Estreptomicina	2 µg/ml	95	14	2 µg/ml	95	100	11	79
	10 µg/ml	103	6	8 µg/ml	103	100	5	83

Tabela 6. Dez Amostras Clínicas (30 testes) e 30 Estirpes Padronizadas CDC (60 testes)
de *M. tuberculosis* testadas em duas ou três localizações com 2 concentrações de Estreptomicina
(Os dados são representados como número total de pontos de dados testados.)

Antibiótico	MAP			VersaTREK/ESP Culture System II				
					Estirpes Sensíveis		Estirpes Resistentes	
	Concentração	N.º S	N.º R	Concentração Equivalente	N.º Acordo	% Acordo	N.º Acordo	% Acordo
Estreptomicina	2 µg/ml	72	18	2 µg/ml	72	100	18	100
	10 µg/ml	77	13	8 µg/ml	77	100	13	100

INFORMAÇÃO DE RISCO
Xn Nocivo
R22 Nocivo por ingestão.
R61 Risco durante a gravidez com efeitos adversos na descendência.
S37 Usar luvas adequadas.
S53 Evitar exposição – obter instruções específicas antes da utilização.

REFERÊNCIAS: Página 7

Para informações adicionais, contacte o Apoio Técnico da TREK Diagnostic Systems através do 1-216-351-8735.

Symbols / Símbolos/ Simboli / Symboles/ Símbolos

LOT	GB ES IT FR PT	Batch code Código de lote Codice del lotto Code du lot Código do grupo	
REF	GB ES IT FR PT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo Référence du catalogue Número de catálogo	
	GB ES IT FR PT	Manufacturer Fabricante Fabbricante Fabricant Fabricante	
	GB ES IT FR PT	Consult instructions for use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso Consulter les instructions d'utilisation Consulte instruções para o uso	
	GB ES IT FR PT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura Limites de température Limitação de temperatura	
	GB ES IT FR PT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro Date de péremption Uso perto	YYYYMMDD/YYYYMM (MM=end of month) aaaammdd/aaaamm (mm=fin del mes) AAAAMMGG/AAAAMM (MM=fine mese) AAAAMMJJ/AAAAMM (MM=fin de mois) YYYYMMDD/YYYYMM (MM= fim do mês)
IVD	GB ES IT FR PT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Dispositivo Médico Diagnóstico	
Σ	GB ES IT FR PT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per <n> saggi Contenu suffisant pour <n> tests Contem suficiente para <n> testes	

EC REP	GB ES IT FR PT	Authorized Representative in the European Community Representante autorizado en la Comunidad Europea Mandatario nella Comunità Europea Mandataire dans la Communauté européenne Representante autorizado na Comunidade Europeia
CONT	GB ES IT FR PT	Contains Contiene Contiene Contient Contém
USE Mtb S	GB ES IT FR PT	For use with the VersaTREK and ESP II systems to perform *M.tuberculosis* susceptibility testing. Para su uso con los sistemas VersaTREK y ESP II en la realización de pruebas de sensibilidad de *M.tuberculosis*. Da utilizzare con i sistemi VersaTREK e ESP II per eseguire il test di sensibilità di *M.tuberculosis*. À utiliser avec les systèmes VersaTREK et ESP II pour effectuer les essais de sensibilité de *M.tuberculosis* Para utilização com os sistemas VersaTREK e ESP II para realização do teste de sensibilidade de *M.tuberculosis*
(STR)	GB ES IT FR PT	Streptomycin Estreptomicina Streptomicina Streptomycine Estreptomicina